

EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs) Y
HALÓGENOS TOTALES MEDIANTE EL USO DE UN CONSORCIO
BACTERIANO AISLADO PRESENTE EN EL ACEITE LUBRICANTE DE MOTOR
USADO

ANDREA VALENTINA GONZALEZ TAUTA
DANIELA MARITZA GONZALEZ LEYTON

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

EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs) Y
HALÓGENOS TOTALES MEDIANTE EL USO DE UN CONSORCIO
BACTERIANO AISLADO PRESENTE EN EL ACEITE LUBRICANTE DE MOTOR
USADO

ANDREA VALENTINA GONZALEZ TAUTA
DANIELA MARITZA GONZALEZ LEYTON

Proyecto integral de grado para optar por el título de
INGENIERO QUIMICO

Director
DANIEL ALEJANDRO LOZANO
Ingeniero Químico

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

Nota de aceptación

Ing. Angie Tatiana Ortega Ramirez

Ing. Mario Andres Noriega Valencia

Bogotá D.C. Agosto de 2019

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente Institucional y Rector del Claustro

Dr. MARIO POSADA GARCÍA PEÑA

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA PEÑA

Vicerrectora Académica y de Postgrados

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Decano Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director Programa Ingeniería Química

Ing. LEONARDO DE JESÚS HERRERA GUTIÉRREZ

Las directivas de la fundación Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento.

Estos corresponden únicamente a los autores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

A Dios por guiarnos y acompañarnos durante el transcurso de nuestras vidas.

A nuestros padres y hermanos quienes fueron incondicionales durante todo el proceso de nuestra formación académica en Ingeniería química, siempre serán nuestra principal motivación.

Al Ingeniero químico Daniel Lozano y profesional en investigación del Sena y CTT por su gran compromiso y colaboración para el desarrollo de este proyecto.

A la microbióloga Liceth Cabrejo gestora del Tecnoparque del Sena por la confianza y el conocimiento brindado para el desarrollo de esta investigación.

A la ingeniera química Claudia Hernandez gestora del Tecnoparque del Sena por el gran aporte de sus conocimientos a el proyecto.

AL CTT centro de tecnologías del transporte del SENA quienes son los financiadores de la investigación

A la línea de biotecnología y nanotecnología de la red Tecnoparque nodo Bogotá, por apoyarnos con todos los suministros y equipos necesarios para el desarrollo del proyecto.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	23
OBJETIVOS	25
1. MARCO TEÓRICO	26
1.1 ACEITES LUBRICANTES	26
1.1.1 Composición media de los aceites lubricantes	26
1.1.2 Funciones de los aceites lubricantes	27
1.1.3 Propiedades de los aceites lubricantes	28
1.1.4 Producción y consumo en Colombia	30
1.1.5 Usos y aplicaciones de los aceites lubricantes	32
1.1.6 Clasificación de los aceites lubricantes para motor	33
1.1.6.1 Sistema de clasificación de viscosidad SAE	33
1.1.6.2 Sistema de clasificación API	33
1.2 ACEITES LUBRICANTES USADOS	33
1.2.1 Contaminantes de los aceites lubricantes usados	34
1.2.1.1 Bifenilos Policlorados	35
1.2.1.2 Halógenos Totales	36
1.2.2 Características fisicoquímicas de los aceites usados	36
1.2.3 Usos no adecuados de los aceites usados	36
1.2.4 Efectos ambientales de los contaminantes presentes en los aceites usados	37
1.2.5 Efectos en la salud de los contaminantes de los aceites lubricantes usados	39
1.2.6 Tratamiento de los aceites usados	40
1.2.7 Tecnologías empleadas para el re-refinamiento de ALU	41
1.2.8 Tratamientos biológicos para el aceite lubricante usado	42
1.2.9 Aplicaciones del aceite lubricante usado tratado	43
1.2.10 Requerimientos y condiciones para clasificación de aceites re-refinados según la NTC 5995 y la resolución 1446 de 2005 del ministerio de medio ambiente	44
1.3 PROCESO MICROBIOLÓGICO	45
1.3.1. Medio de cultivo	45
1.3.1.1 Tipos básicos de medios de cultivo	46
1.3.2 Esterilización	47
1.3.2.1 Métodos de Esterilización	47
1.3.3 Siembra de Microorganismos	47
1.3.3.1 Técnicas de Siembra en Cajas de Petri	48
1.3.3.2 Técnicas de Siembra en medios contenidos en tubos	48
1.3.4 Condiciones generales para el cultivo	49
1.3.5 Identificación Microbiana	49
1.3.5.1 Características microscópicas	50

1.3.5.2 Características macroscópicas	50
1.4 Biodegradación de los Bifenilos Policlorados	51
1.4.1 Biodegradación aerobia de los Bifenilos Policlorados a partir de bacterias	51
1.4.2 Biodegradación anaeróbica de los Bifenilos Policlorados.	53
1.5 BIORREACTOR	54
1.5.1 Método de operación o alimentación de los biorreactores	55
1.5.1.1 Batch	55
1.5.1.2 Fed-Batch	56
1.5.1.3 Continuo	56
1.5.2 Clasificación de los biorreactores	57
1.5.2.1 Biorreactor tubular	57
1.5.2.2 Biorreactor tipo panel	57
1.5.2.3 Fotobiorreactor (FBR)	57
1.5.2.4 Biorreactor air-lift	57
1.5.3 Agitación en biorreactores	58
1.5.4 Mezclado en biorreactores	59
1.5.5 Variables de interés para un biorreactor	59
1.5.5.1 Temperatura	59
1.5.5.2 Nutrientes	59
1.4.5.3 Iluminación	59
1.5.5.4 pH	60
1.5.6 Materiales para la construcción de Biorreactores	60
1.5.7 Aplicaciones de Biorreactores	60
2. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL ACEITE LUBRICANTE USADO DE MOTOR DIESEL	61
2.1 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL ACEITE USADO DE MOTOR DIESEL	61
2.1.1 Muestreo del aceite lubricante usado	61
2.2 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA INICIAL	62
2.2.1 Densidad	63
2.2.2 Viscosidad	64
2.2.3 pH	64
2.2.4 Análisis Infrarrojo	67
2.2.4.1 Oxidación	67
2.2.4.2 Nitración	67
2.2.4.3 Hollín	67
2.2.4.4 Sulfatación	68
2.2.4.5 Glicol	68
2.2.4.6 Agua	68
2.2.4.7 Combustible	69
2.2.5 Espectrometría	69
2.2.5.1 Calcio (Ca)	69
2.2.5.2 Magnesio (Mg)	69
2.2.5.3 Molibdeno (Mo)	70

2.2.5.4 Fosforo (P)	70
2.2.5.5 Zinc (Zn)	70
2.2.5.6 Silicio (Si)	70
2.2.5.7 Sodio (Na)	70
2.2.5.8 Aluminio (Al)	70
2.2.5.9 Cromo (Cr)	71
2.2.5.10 Cobre (Cu)	71
2.2.5.11 Hierro (Fe)	71
2.2.5.12 Plomo (Pb)	71
2.2.5.13 Manganeso (Mn)	71
2.2.5.14 Níquel (Ni)	72
2.2.5.15 Plata (Ag)	72
2.2.5.16 Estaño (Sn)	72
2.2.5.17 Vanadio (V)	72
2.2.5.18 Bario (Ba)	72
2.2.6 TAN	72
2.2.7 TBN	73
2.2.8 Carbón Residual	73
2.2.9 Bifenilos Policlorados	74
2.2.10 Halógenos Totales	74
3. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA LAS CEPAS SELECCIONADAS	76
3.1 FILTRACIÓN DEL ACEITE LUBRICANTE USADO	76
3.2 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	77
3.3 SIEMBRA DE MICROORGANISMOS	78
3.3.1 Siembra en Cajas de Petri	78
3.3.2 Siembra en Tubos de Ensayo	78
3.3.3 Incubación del consorcio	78
3.3.4 Evaluación cualitativa del consorcio bacteriano	78
3.3.4.1 Descripción macroscópica del consorcio	79
3.3.4.2 Descripción microscópica del consorcio	80
3.3.4.3 Tinción de Gram	80
3.4 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	80
3.4.1 Recuperación de microorganismos	80
3.4.2 Aumento de la carga bacteriana	81
3.4.2.1 Medio de cultivo solido enriquecido	81
3.4.2.2 Medio de cultivo liquido enriquecido	82
3.4.3 Medio de Cultivo óptimo	82
3.4.4 Purificación de las cepas	83
3.4.5 Incubación de cepas aisladas	84
3.4.6 Evaluación cualitativa de las cepas aisladas	84
3.4.6.1 Pruebas bioquímicas api	84
3.5 ANÁLISIS DE RESULTADOS	85
3.5.1 Evaluación cualitativa del consorcio bacteriano	85

3.5.2 Evaluación cualitativa de las cepas aisladas	85
3.5.2.1 Identificación bioquímica api	88
3.5.3 Determinación de condiciones óptimas del consorcio aislado	89
3.5.3.1 Cepa A (<i>Bacillus licheniformis</i>)	90
3.5.3.2 Cepa B (<i>Bacillus lentus</i>)	90
3.5.3.3 Cep C (<i>Bacillus circulans</i>)	90
3.5.3.4 Cepa D (<i>Streptococcus uberis</i>)	90
4. TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE LOS ACEITES LUBRICANTES USADOS DE MOTOR DIÉSEL PARA LA REMOCIÓN DE HALOGENUROS TOTALES Y BIFENILOS POLICLORADOS	93
4.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL	93
4.1.1 Objetivo experimental	93
4.1.2 Tratamiento microbiológico	94
4.1.3 Adecuación de las muestras	95
4.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS	95
4.2.1 Evaluación cualitativa del tratamiento biológico	95
4.2.2 Evaluación Cuantitativa del tratamiento biológico	99
4.2.2.1 Resultados del tratamiento	99
4.2.2.2 Porcentaje de remoción	102
4.2.2.3 Calidad del aceite	103
5. DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIFICACIONES TÉCNICAS PARA EL DISEÑO DE UN BIORREACTOR PARA EL CULTIVO BACTERIANO	106
5.1 MODO DE OPERACIÓN DEL BIORREACTOR	106
5.2 VARIABLES DE INTERES	106
5.2.1 Temperatura	107
5.2.2 Presión	108
5.2.3 pH	108
5.2.4 Presencia de Oxígeno	108
5.2.5 Agitación	110
5.2.6 Nivel	110
5.2.7 Tiempo de residencia	110
5.3 SISTEMAS DE CONTROL	111
5.4 VOLUMEN Y DIMENSIONES DEL BIORREACTOR	111
5.5 PROPORCION DE REACTIVOS	118
5.6 MATERIALES PARA EL BIORREACTOR	119
5.6.1 Matriz de selección	120
5.6.2 Criterios de selección	121
5.6.2.1 Resistencia a procesos de esterilización	122
5.6.2.2 Resistencia a la corrosión	122
5.6.2.3 Resistencia a los golpes	122
5.6.2.4 Material inerte	122
5.6.2.5 Transparencia	122
5.6.2.6 Costo	123

5.6.3 Resultado de la matriz de selección	122
6. CONCLUSIONES	125
7. RECOMENDACIONES	126
BIBLIOGRAFÍA	128
ANEXOS	135

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición media de aceite base	26
Tabla 2. Distribución del mercado de aceites lubricantes en Colombia	31
Tabla 3. Características típicas de los aceites usados	36
Tabla 4. Resultados de la caracterización inicial del aceite usado de motor	62
Tabla 5. Datos experimentales para la densidad del ALU	63
Tabla 6. Datos experimentales para el pH-i del aceite usado	65
Tabla 7. Medio de cultivo Bushnell Haas	77
Tabla 8. Composición Agar Nutritivo	81
Tabla 9. Composición caldo nutritivo	82
Tabla 10. Porcentaje de remoción de Bifenilos Policlorados	103
Tabla 11. Porcentaje de remoción de Halógenos Totales	103
Tabla 12. Dimensiones del Biorreactor	116

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Contaminantes de los aceites usados según su origen	34
Cuadro 2. Consecuencias del mal uso de los aceites lubricantes usados	37
Cuadro 3. Efectos ambientales derivados del mal manejo de los aceites usados	38
Cuadro 4. Efectos sobre la salud de los contaminantes presentes en el ALU	39
Cuadro 5. Tecnologías empleadas para el re-refinamiento de los ALU	41
Cuadro 6. Métodos, fuentes y tipos de agentes esterilizantes en Microbiología	47
Cuadro 7. Límites utilizados como referencia	66
Cuadro 8. Cepas purificadas	83
Cuadro 9. Identificación del Consorcio Bacteriano	85
Cuadro 10. Identificación macroscópica y microscópica de las cepas aisladas	86
Cuadro 11. Identificación de las cepas aisladas por pruebas bioquímicas API	88
Cuadro 12. Condiciones óptimas de crecimiento	91
Cuadro 13. Proporciones de reactivos del tratamiento biológico	93
Cuadro 14. Características de los materiales preseleccionados	119
Cuadro 15. Matriz de selección para el material del biorreactor	122
Cuadro 16. Instrumentos utilizados durante la experimentación	135
Cuadro 17. Equipos utilizados durante la experimentación	144
Cuadro 18. Reactivos utilizados durante la experimentación	148
Cuadro 19. Evidencia de la investigación	172

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Volumen del inóculo	112
Ecuación 2. Volumen del medio	112
Ecuación 3. Volumen de seguridad	113
Ecuación 4. Volumen del Biorreactor	113
Ecuación 5. Área base del biorreactor	114
Ecuación 6. Radio del biorreactor	114
Ecuación 7. Volumen geométrico del biorreactor	115

LISTA DE ILUSTRACIONES

	pág.
Ilustración 1. Variación real del índice de ventas de lubricantes para autos.	31
Ilustración 2. Ventas nacionales de lubricante por tipo	32
Ilustración 3. Resultados de experimentación	43
Ilustración 4. Requisitos de las bases lubricantes re-refinadas	44
Ilustración 5. Tabla de porcentajes para mezcla y límites máximos de contaminantes en aceites usados tratados	45
Ilustración 6. Vía de degradación de BPCs mediante bacterias	53
Ilustración 7. Mecanismo de decoloración reductiva de BPCs catalizada por bacterias anaerobias	54
Ilustración 8. Tipo de Biorreactores	56
Ilustración 9. Esquema de un reactor air-lift	58
Ilustración 10. Selección de condiciones óptimas de crecimiento para el consorcio aislado	76
Ilustración 11. Difusor de burbujas finas para el biorreactor	109
Ilustración 12. Biorreactor con sus dimensiones	117
Ilustración 13. Plano Biorreactor	117
Ilustración 14. Biorreactor para el cultivo bacteriano	123
Ilustración 15. Caracterización fisicoquímica inicial	149
Ilustración 16. Medio de cultivo Bushnell Haas	150
Ilustración 17. Tinción de Gram	151
Ilustración 18. Caracterización inicial de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales presentes en el aceite	153
Ilustración 19. Pruebas	154
Ilustración 20. Identificación api Cepa A	155
Ilustración 21. Identificación api Cepa B	156
Ilustración 22. Identificación api Cepa C	157
Ilustración 23. Identificación api Cepa D	158
Ilustración 24. Adecuación de las muestras	159
Ilustración 25. Concentración final de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales para la alternativa 1 (25%MEDIO / 75% ALU)	161
Ilustración 26. Concentración final de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales para la réplica de la alternativa 1 (25%MEDIO / 75% ALU)	162
Ilustración 27. Concentración final de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales para la alternativa 2 (50%MEDIO / 50% ALU)	164
Ilustración 28. Concentración final de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales para la réplica de la alternativa 2 (50%MEDIO / 50% ALU)	166
Ilustración 29. Concentración final de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales para la alternativa 3 (75%MEDIO / 25% ALU)	168
Ilustración 30. Concentración final de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales para la réplica de la alternativa 3 (75%MEDIO / 25% ALU)	170

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Turbidez y Precipitado Alternativa 1	96
Gráfica 2. Turbidez y Precipitado réplica alternativa 1	97
Gráfica 3. Turbidez y Precipitado alternativa 2	97
Gráfica 4. Turbidez y Precipitado réplica alternativa 2	98
Gráfica 5. Turbidez y Precipitado alternativa 3	98
Gráfica 6. Turbidez y Precipitado réplica alternativa 3	99
Gráfica 7. Concentración de Halógenos Totales	100
Gráfica 8. Concentración de Bifenilos Policlorados	101
Gráfica 9. Densidad Vs Viscosidad	104
Gráfica 10. pH	105

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Instrumentos de laboratorio utilizados durante la experimentación	135
Anexo B. Equipos utilizados durante la experimentación	144
Anexo C. Reactivos utilizados durante la experimentación	148
Anexo D. Caracterización fisicoquímica del aceite lubricante usado de motor	148
Anexo E. Preparación medio de cultivo Bushnell Haas	150
Anexo F. Procedimiento Tinción de Gram	151
Anexo G. Caracterización de Bifenilos Policlorados y Halógenos totales del aceite lubricante usado	152
Anexo H. Pruebas bioquímica api	154
Anexo I. Identificación API de la cepa A	155
Anexo J. Identificación API de la cepa B	156
Anexo K. Identificación api de la cepa C	157
Anexo L. Identificación api de la cepa D	158
Anexo M. Adecuación de las muestras	159
Anexo N. Caracterización de Bifenilos Policlorados y Halógenos totales del aceite lubricante tratado en una proporción de 25% Medio / 75% ALU	160
Anexo O. Caracterización de Bifenilos Policlorados y Halógenos totales del aceite lubricante tratado en una proporción de 25% Medio / 75% ALU réplica	161
Anexo P. Caracterización de Bifenilos Policlorados y Halógenos totales del aceite lubricante tratado en una proporción de 50% Medio / 50% ALU	164
Anexo Q. Caracterización de Bifenilos Policlorados y Halógenos totales del aceite lubricante tratado en una proporción de 50% Medio / 50% ALU réplica	166
Anexo R. Caracterización de Bifenilos Policlorados y Halógenos totales del aceite lubricante tratado en una proporción de 75% Medio / 25% ALU	168
Anexo S. Caracterización de Bifenilos Policlorados y Halógenos totales del aceite lubricante tratado en una proporción de 75% Medio / 25% ALU réplica	169
Anexo T. Evidencia experimentacion	172

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A: Área

ALU: Aceite lubricante usado de motor Diésel.

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

api: *Analytical Profile Index* - Índice Analítico de Perfil

ASTM: *American Socitey for Testing and Materials* – Sociedad Americana para Ensayos y Materiales.

BR: Biorreactor.

cm: centímetros

cSt: Centistoke

CTT: Centro de Tecnologías del Transporte.

D: Diámetro

FBR: Fotobiorreactor.

g: gramos

GEI: Gases de efecto invernadero

h: Altura

h_l: Altura del Líquido

L: litros

mg: miligramos

mL: mililitros

NTC: Norma Técnica Colombiana.

PBB: Bifenilos Polibromados

PCB: Bifenilos Policlorados.

PCT: Terfenilos Policlorados

pH: Potencial de Hidrogeno

r: radio

rpm: Revoluciones por minuto.

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

T: Temperatura

TAN: Número acido total es una medida de la concentración de ácido presente en el aceite lubricante.

TBN: Numero básico total el cual representa la alcalinidad dada en mg de Hidróxido de Potasio que tiene un gramo de aceite (mgKOH/g).

UFC: Unidades formadoras de colonia.

V: Volumen

%: Porcentaje

%R: Porcentaje de Remoción

°C: Grados Celsius

GLOSARIO

ACEITE LUBRICANTE USADO: es catalogado como todo aceite lubricante que ha perdido sus propiedades iniciales por el uso del mismo.

AISLAMIENTO BACTERIANO: separación de colonias de un determinado tipo de microorganismos del resto que la acompañan

BIFENILOS POLICLORADOS: compuestos organoclorados y volátiles que son considerados como tóxicos y peligrosos.

BIOESTIMULACIÓN: proceso en el cual se estimula el crecimiento bacteriano con el fin de la incrementar y mejorar la capacidad de degradación de la población microbiana.

CEPA BACTERIANA: conjunto de bacterias con igualdad de características biológicas, es decir bacterias de la misma especie.

COLONIA BACTERIANA: agrupación de bacterias provenientes de una bacteria madre con el mismo género y especie.

CONTAMINANTE: sustancia que se encuentra presente en un medio al cual no pertenece y por ende puede causar efectos adversos a la salud y el ambiente.

DEGRADACIÓN: proceso en el cual un contaminante es eliminado o metabolizado por agentes externos como bacterias, procesos fisicoquímicos entre otros.

HALOGENOS TOTALES: hacen referencia a un grupo de 6 elementos diferentes, los cuales comparten propiedades químicas similares.

INOCULO: suspensión de bacterias utilizadas en el tratamiento de los aceites lubricantes usados de motor

MEDIO DE CULTIVO: es una mezcla de nutrientes en condiciones adecuadas ideales para el crecimiento esencial de microorganismos.

REMOCIÓN: eliminación o disminución de un contaminante.

TERMOSTATO: instrumento automático que sirve para la regulación de temperatura en un sistema

TRATAMIENTO: procedimiento que es aplicado a variables independientes el cual genera un cambio en los valores de las variables que son dependientes.

RESUMEN

Los aceites lubricantes usados de motor Diésel contienen un alto nivel de contaminantes que adquieren a lo largo de su vida útil, los más comunes son los metales pesados tales como el hierro, cobre, zinc, entre otros; estos pueden provenir del desgaste de las piezas del motor o de la adición de aditivos. Sin embargo, no son los únicos, existen otros no tan comunes y más complicados de tratar como lo son los Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales que al no ser removidos del aceite correctamente pueden causar graves impactos ambientales y a la salud. Esta investigación tiene como enfoque el tratamiento del aceite lubricante usado para la remoción de estos últimos contaminantes por medio de un consorcio bacteriano aislado presente en el mismo.

El aislamiento y la identificación de cada una de las cepas bacterianas pertenecientes al consorcio tuvo una duración de 3 meses, siguiente a esto se realizó el tratamiento del aceite lubricante usado (ALU) a tres proporciones diferentes de consorcio/ALU y finalmente se establecieron las especificaciones técnicas para el diseño del Biorreactor para el cultivo del consorcio bacteriano.

La investigación determinó que el consorcio está conformado por cuatro cepas diferentes, tres pertenecientes al género *Bacillus* y una al género *Streptococcus*; con las cuales se llevo a cabo el tratamiento biológico del ALU durante 7 días, a una temperatura de 36 °C, 100 rpm y en condición de aerobiosis; dicho cultivo mixto logro una remoción máxima del 99.2 % de los Halógeno Totales y de un 84,52 % de Bifenilos Policlorados presentes en el aceite lubricante usado.

Palabras clave: ALU, Bifenilos Policlorados, Halógenos Totales, Tratamiento, Biorreactor, Remoción.

ABSTRACT

Used diesel lubricating oils contain a high level of contaminants that acquire throughout their useful life, the most common are heavy metals such as iron, copper, zinc, among others, these can come from the deterioration of engine parts or the addition of additives. However, they are not the only ones, there are others which are not so common and more complicated to treat such as Polychlorinated Biphenyls and Total Halogens which, when they are not removed from the oil correctly, can cause serious environmental and health impacts. This research has as focus the treatment of the lubricating oil used for the removal of these last pollutants by means of an isolated bacterial consortium present in it.

The isolation and identification of each of the bacterial strains belonging to the consortium had a duration of 3 months, followed by the treatment of the used lubricating oil (ULO) at three different consortium/ULO proportions and finally the technical specifications for the design of the bioreactor for the bacterial consortium culture were established.

The investigation determined that the consortium is formed by four different strains, three belonging to the genus *Bacillus* and one to the genus *Streptococcus*; with which the biological treatment of ULO was carried out during 7 days, at a temperature of 36 °C, 100 rpm and in aerobic condition; this mixed culture achieved a maximum removal of 99.2% of Total Halogens and 84.52% of Polychlorinated Biphenyls present in the used lubricating oil.

Keywords: ULO, Polychlorinated Biphenyls, Total Halogens, Treatment, Bioreactor, Removal.

INTRODUCCIÓN

La utilización de fuentes fósiles tales como el crudo, el petróleo y el gas, los cuales constituyen aproximadamente el 85% de la canasta energética utilizados para suplir la demanda a nivel mundial y nacional, genera una serie de impactos que corresponden a : La disminución de los recursos naturales no renovables, la dependencia energética al no contar con los recursos naturales suficientes que satisfagan la demanda interna de cada país y por último el aumento de los gases de efecto invernadero (GEI) generados por los diferentes procesos de combustión¹. Como consecuencia de la utilización de combustibles fósiles para la generación de energía, el sector de transporte tiene una contribución respecto a la emisión de los GEI con un valor de 72.5 Megatoneladas alrededor de todo el mundo².

Los impactos mencionados se reflejan en la obtención de energía, el desarrollo económico y tecnológico de Colombia; principalmente del sector transporte que se cataloga como el principal consumidor de energía con una participación del 40.32% de la total consumida; utilizando como principal fuente energética el petróleo y sus derivados³. Para el sector automotriz el consumo de aceites lubricantes en Colombia es de 25´740.000 galones al año; del total del consumo en el país se sabe que 14´000.000 galones/año de aceites lubricantes son tratados para ser reutilizados y estos a su vez tienen una equivalencia aproximada del 36% del consumo, por tanto, se deduce que más del 60% de estos aceites no tienen una buena disposición y generalmente son vertidos en cauces de agua, alcantarillado, rellenos sanitarios o son quemados⁴.

Debido a ello, en Colombia para el año 1996 y según la ley 253 los aceites utilizados fueron catalogados como residuos peligrosos al pertenecer al grupo de sustancias y artículos de desechos que contengan, o estén contaminados por Bifenilos Policlorados (PCB), Terfenilos Policlorados (PCT) o Bifenilos polibromados (PBB)⁵.

¹Castro, Fredy, Morales, Cortázar, Trujillo. Investigación Centro De Tecnologías De Transporte (CTT). Bogotá D, C: 2016. p. 12

² Ibíd., p. 12.

³ REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE MINAS Y ENERGÍA. Proyección de demanda combustibles líquidos en Colombia. [Sitio WEB]. Bogotá D.C. La entidad. [10, septiembre, 2018]. Disponible en:
<http://www1.upme.gov.co/DemandaEnergetica/Proyeccio%CC%81nDemandaL%C3%ADquidos-Rev2016.pdf>

⁴ REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Manual técnico para el manejo de aceites lubricantes usados de origen automotor e industrial. [Sitio WEB]. Bogotá D.C: 2014. La entidad. [11, septiembre, 2018]. Disponible en:
<https://acp.com.co/web2017/images/pdf/combustiblesylubricantes/FAU/Manual-AU-final-14.pdf>

⁵ COLOMBIA. CONGRESO DE LA REPUBLICA. Ley 253 (17, enero, 1996). Por medio de la cual se aprueba el Convenio de Basilea sobre el control de los movimientos

Una alternativa para mitigar los efectos negativos que se generan por el uso excesivo de las fuentes fósiles es la reutilización de residuos con altos contenidos de hidrocarburos como los son los aceites usados de motor diésel, que al reducir la carga contaminante derivada de su uso a partir de diferentes tratamientos se puede usar como una base parafínica que puede ser aprovechada como combustibles o lubricante; y al mismo tiempo contribuir con la generación de conocimiento y tecnología para afrontar los nuevos avances tecnológicos mundiales que se derivan de estas problemáticas⁶.

Los tratamientos convencionales utilizados para aprovechar los aceites lubricantes son principalmente procesos fisicoquímicos dentro de los cuales se encuentran, el método de ácido arcilla, el proceso BERK, el proceso KTI entre otros, los cuales, aunque brindan una alternativa para la reutilización de los aceites lubricantes tienen al mismo tiempo un gran inconveniente, estos tratamientos generan residuos peligrosos debido a la utilización de productos químicos en su implementación, además de ser muy costosos. Por tanto, se ve la necesidad de implementar tratamientos en los cuales no se generen residuos peligrosos o tóxicos, ni de difícil manejo y que sean al mismo tiempo rentables; por ende, el tratamiento microbiológico es una excelente alternativa.

Por lo anterior, la presente investigación se basa en evaluar el proceso microbiológico para el tratamiento de residuos tóxicos y peligrosos presentes en los aceites lubricantes usados de motor Diésel; mediante la aplicación del tratamiento seleccionado se busca principalmente la remoción de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales del aceite lubricante usado, ya que estos son considerados compuestos peligrosos y cancerígenos.

transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación, hecho en Basilea el 22 de marzo de 1989. En: Presidencia de la Republica de Colombia. Bogotá D.C.1996. 4 p.

⁶ INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. World Energy Outlook 2015. [En línea]. Paris, Francia: 2015. [Consultado 11, septiembre, 2018]. Disponible en: <https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/WEO2015.pdf>

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la disminución de Bifenilos Policlorados (PCBs) y Halógenos Totales, mediante el uso de un consorcio bacteriano aislado presente en el aceite lubricante de motor usado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las características del aceite de motor Diésel usado de forma química y física.
- Establecer las condiciones de crecimiento para las cepas seleccionadas.
- Cuantificar la remoción de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales en el aceite lubricante usado mediante las cepas seleccionadas.
- Establecer las especificaciones técnicas para el diseño de un biorreactor para el cultivo bacteriano.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ACEITES LUBRICANTES

Los aceites lubricantes son sustancias provenientes del petróleo y compuestas, generalmente la mayoría de los aceites contienen diversos tipos de hidrocarburos que son utilizados para disminuir la fricción de las partes rodantes o deslizantes, limpiar algunas piezas, enfriar los sistemas y proteger contra la corrosión. Los aceites lubricantes son una combinación de aceites base que suministran características lubricantes primarias y aditivos que sirven para aumentar la eficiencia, rendimiento y vida útil de estos. Los aceites base están compuestos por hidrocarburos entre el 75% y el 85% de la composición total⁷.

1.1.1 Composición media de los aceites lubricantes. Los aceites pueden ser de diferentes tipos, mineral, procesos de refinación o sintéticos por síntesis química. La mezcla de aceites sintéticos y minerales da lugar a los aceites base semisintéticos. En la tabla 1 se muestra la composición media de hidrocarburos presentes en los aceites base.

Tabla 1. Composición media de aceite base.

Tipo de sustancia	Hidrocarburo	Composición
Parafinas	Alcanos	45 - 76%
Naftenos	Ciclo alcanos	13 - 45%
Aromáticos	Aromáticos	10 – 30%

Fuente: REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Manual técnico para el manejo de aceites lubricantes usados de origen automotor e industrial. [Sitio WEB]. Bogotá D.C: 2014. La entidad. [11, septiembre, 2018]. Disponible en: <https://acp.com.co/web2017/images/pdf/combustiblesylubricantes/FAU/Manual-AU-final-14.pdf>

- **Bases minerales:** son un subproducto de la refinación del crudo, sus características son dependientes del origen del crudo y el proceso específico de refinación utilizado por el fabricante. Este tipo de bases contienen excelentes propiedades por lo que el crudo parafínico es uno de los más utilizados en la

⁷ REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Op. Cit, p.14.

fabricación de aceites lubricantes. Los crudos aromáticos y naftenos le atribuyen al aceite propiedades importantes como una mejora al comportamiento a temperaturas bajas y un gran poder disolvente⁸.

- **Bases sintéticas:** las bases sintéticas son elaboradas partir de reacciones petroquímicas. Estas aportan mejores propiedades lubricantes, mayor punto de fluidez a temperaturas bajas, alta estabilidad térmica, alta estabilidad a la oxidación, alto índice de viscosidad y menores volatilidades, en comparación con las minerales⁹.
- **Bases semisintéticas:** se componen de una mezcla de bases minerales y bases sintéticas en diferentes proporciones, dicha mezcla conserva las propiedades de los aceites sintéticos¹⁰.
- **Bases vegetales:** se utilizan para la producción de “aceites verdes” biodegradables y no tóxicos¹¹.

1.1.2 Funciones de los aceites lubricantes. Los aceites lubricantes tienen papeles fundamentales como evitar el rozamiento entre piezas o materiales, aumentar el rendimiento de los equipos o motores en los cuales son utilizados, entre otros; además de esto también desempeñan otras actividades fundamentales para que asegurar el correcto funcionamiento de la maquinaria manteniéndola en buenas condiciones durante largos periodos¹². Entre estas otras funciones, cabe destacar las siguientes:

- **Refrigeración:** esta función es la segunda más importante luego de lubricar ya que ayuda a la disipación del calor manteniendo el equilibrio térmico de la máquina que se produce debido a los rozamientos, frotamientos, combustión entre otros. En algunos casos el equipo no cuenta con un sistema de refrigeración esta función será muy útil gracias a que únicamente se podrá eliminar calor mediante el aceite. Se podrá decir entonces que el aceite contribuye a eliminar entre un 10% y un 25% del calor total generado en la máquina¹³.
- **Eliminación de impurezas:** las máquinas y equipos lubricados generan contaminantes o impurezas de todo tipo, propias de los procesos ejecutados

⁸ GULF OIL INTERNACIONAL. Manual técnico Gulf. [Sitio WEB]. Buenos Aires, Argentina: La entidad [09, septiembre, 2018]. Disponible en: http://remex.com.ar/descargas_web/1-1%20Gulf%20-%20Manual%20Tecnico%20de%20Lubricantes.pdf

⁹ *Ibíd.*, p.7.

¹⁰ *Ibíd.*, p.7.

¹¹ *Ibíd.*, p.7.

¹² *Ibíd.*, p.2.

¹³ GULF OIL INTERNATIONAL. Op. Cit., p.3.

como la combustión), partículas provenientes de la corrosión o del desgaste y contaminantes externos como polvo, agua, etc. Lo que hace el lubricante es eliminar mediante la circulación de estas impurezas, así manteniéndolas en suspensión en el seno y llevándolos hasta los elementos filtrantes. Esta función es importante para que las partículas no se depositen en el equipo y que no se acelere el desgaste en cadena, que puedan taponar conductos de lubricación o producir consecuencias duras para las partes mecánicas lubricadas¹⁴.

- **Anticorrosivo y anti-desgaste:** los lubricantes contienen propiedades que pueden aumentarse con aditivos especiales, como por ejemplo para ayudar a la preservación de la corrosión de diferentes tipos de metales y aleaciones que conforman las piezas del equipo o las estructuras y/o piezas mecánicas¹⁵.
- **Sellante:** un ejemplo donde el lubricante debe cumplir la función de sellante es en la cámara de la combustión de los motores de combustión interna y en los émbolos de los amortiguadores hidráulicos, esto se debe a que el lubricante realiza estancas en zonas donde pueda existir fugas de otros líquidos para evitar la contaminación y disminuir el riesgo del bajo rendimiento¹⁶.
- **Transmisor de energía:** los lubricantes tienen otra función característica que es transmitir energía de un punto a otro del sistema, este es un comportamiento típico de los fluidos hidráulicos. Los aceites lubricantes que abastecen las necesidades del mercado son utilizados en el sector industrial: mediante los aceites de proceso, de turbinas, hidráulicos, de corte, de transformador, solubles, de temple o blancos, así como los lubricantes que abastecen el sector automotor, como aceites para motores a gasolina, para motores diésel, transmisión y de dos tiempos¹⁷.

1.1.3 Propiedades de los aceites lubricantes. Los aceites lubricantes tienen diversas funciones a realizar durante el tiempo de servicio, para ello deben cumplir con especificaciones en sus propiedades con el fin de cumplir con los estándares reglamentarios; estas propiedades se describen a continuación:

- **Índice de viscosidad (LV):** se entiende como índice de viscosidad a la relación existente entre la viscosidad y la temperatura del aceite. Para medir el índice de viscosidad se establece una escala donde un valor de 100 hace referencia a un aceite altamente parafínico y cero a un aceite altamente nafténico. Un aceite de alto LV presenta menos cambios en la viscosidad con la variación de la temperatura que un aceite de bajo LV, ya que la escala del índice de viscosidad

¹⁴ *Ibíd.*, p. 3.

¹⁵ *Ibíd.*, p. 3.

¹⁶ *Ibíd.*, p. 3.

¹⁷ GULF OIL INTERNATIONAL. Op. Cit., p.3.

es muy sensitiva¹⁸.

- **Punto de fluidez:** se llama punto de fluidez, al valor de temperatura en el cual el aceite escasamente fluye bajo condiciones de prueba determinadas. Esta propiedad junto con la viscosidad permite determinar si un aceite es apto para el funcionamiento en clima frío¹⁹.
- **Residuo de carbono:** hace referencia a la cantidad de carbono que permanece después de someter el aceite a calentamiento sin estar en contacto con el aire, es decir, después de la evaporación de la parte volátil del aceite. La prueba es medida de la cantidad de componentes pesados que permanecen en el fondo, de igual forma indica la volatilidad del aceite²⁰.
- **Resistencia a la oxidación:** en los aceites lubricantes se forman productos perjudiciales provenientes de la oxidación, debido a que el aceite se somete a altas temperaturas en presencia de aire. La capacidad que tiene un aceite para resistir la oxidación bajo determinadas condiciones se define calentándolo entre 300-500°F, pasando aire a través del aceite y con cobre o hierro presentes como catalizadores. Sin embargo, el aceite lubricante durante su tiempo de servicio está sujeto a gran variedad de condiciones oxidantes, por ello ninguna prueba puede relacionarse perfectamente con el servicio real²¹.
- **Resistencia a la corrosión:** hace referencia a la capacidad que tiene el aceite lubricante para evitar la corrosión en las piezas metálicas, para ello se exponen pequeñas partes de dicho metal al aceite por un par de horas; el aceite se mantiene generalmente a 350 °F aproximadamente y bien agitado. Si no se presentan pérdidas de peso en las probetas, podría afirmarse que el aceite lubricante no es corrosivo. Esta propiedad puede mejorarse agregando aditivos calificados como anticorrosivos²².
- **Detergencia:** esta propiedad evita que los productos de la combustión y la oxidación se depositen en el motor limpio. Y ejerce una acción disolvente o de limpieza sobre los residuos acumulados en los motores sucios. Por ello es importante que el aceite tenga esta capacidad detergente y la prueba más

¹⁸ 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]. Tesis. Universidad EAFIT, Medellín, Colombia: 2006. [Consultado 09, septiembre, 2018]. Disponible en: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/021246/portada.pdf>

¹⁹ *Ibíd.*, p. 24.

²⁰ *Ibíd.*, p. 25.

²¹ *Ibíd.*, p. 25.

²² AGUDELO LÓPEZ, Sebastián y HERNÁNDEZ BAENA, Diego Andrés. Op. Cit., p. 25.

adecuada para medir esta propiedad es un ensayo real en el motor²³.

- **Dispersión:** propiedad de un aceite lubricante de motor que hace que las impurezas insolubles que se forman gracias a la combustión y oxidación del aceite se mantengan suspendidas. Cuando un aceite tiene baja calidad de dispersión estos compuestos se precipitan o aglomeran formando una notable capa de depósitos en diferentes partes del motor. Para mejorar esta propiedad en los aceites se incorporan aditivos dispersantes²⁴.
- **Estabilidad de la espuma:** los aceites siempre que son agitados forman espuma. Esta propiedad hace referencia a la capacidad del aceite para evitar la formación de espumas estables, la cuales se generan principalmente cuando el aceite contiene aditivos detergentes o dispersantes. Esta característica se mejora gracias a la incorporación de aditivos conocidos como antiespumantes²⁵.
- **Características de presión extrema:** hace referencia a la habilidad que tiene un aceite de actuar como lubricante a condiciones de presión extrema, esto se permite gracias a los aditivos clasificados como agentes de presión extrema²⁶.
- **Reacción con el agua:** se entiende como la capacidad que posee un aceite para separarse del agua, se determina por medio de una mezcla de partes iguales de agua y aceite, evaluando el tiempo que requiere dicha separación²⁷.
- **Homogeneidad:** capacidad que tiene el aceite de homogenizarse con los aditivos, no debe existir separación alguna que se indica generalmente por un enturbiamiento en el aceite²⁸.
- **Compatibilidad:** hace referencia a la propiedad de los aceites lubricantes para ser compatibles con aditivos y otros aceites, para predecir el comportamiento de la mezcla. Cualquier variación por mínima que sea en la concentración del aditivo provoca diferencias notables en el funcionamiento del lubricante²⁹.

1.1.4 Producción y consumo en Colombia. En Colombia la producción de aceites lubricantes se da en un 95 % por multinacionales como Chevron, Texaco, Petrobras, Castrol y empresas nacionales como Terpel y Brío. El otro 5% se refiere a productores nacionales que no reportan a ninguna entidad. Del 95% inicial, la

²³ *Ibíd.*, p. 26.

²⁴ *Ibíd.*, p. 26.

²⁵ *Ibíd.*, p. 27.

²⁶ *Ibíd.*, p. 27.

²⁷ *Ibíd.*, p. 28.

²⁸ AGUDELO LÓPEZ, Sebastián y HERNÁNDEZ BAENA, Diego Andrés. *Op. Cit.*, p. 29.

²⁹ *Ibíd.*, p. 29.

distribución del mercado se estableció para diferentes segmentos como se evidencia en la Tabla 2.

Tabla 2. Distribución del mercado de aceites lubricantes en Colombia.

Segmento	Porcentaje
Industrial	13%
De proceso	19%
Automotor	68%

Fuente: ASOCIACIÓN COLOMBIANA DEL PETRÓLEO. Informe estadístico Petrolero 2013. [Sitio WEB]. Bogotá D.C. La entidad. [15, diciembre, 2018]. Disponible en: https://acp.com.co/web2017/images/pdf/publicaciones_e_informes/informe_estadistico_petrolero/Informe%20Estadistico%20Petrolero%202013.pdf

Según el Dane el comercio de los lubricantes para el año 2015 tuvo una subida importante, como el año en que las ventas de aceites lubricantes fueron históricas debido a que obtuvo unas cifras que superaron el año 2011 en un 11% como se muestra a la ilustración 1.³⁰

Ilustración 1. Variación real del índice de ventas de lubricantes para autos.

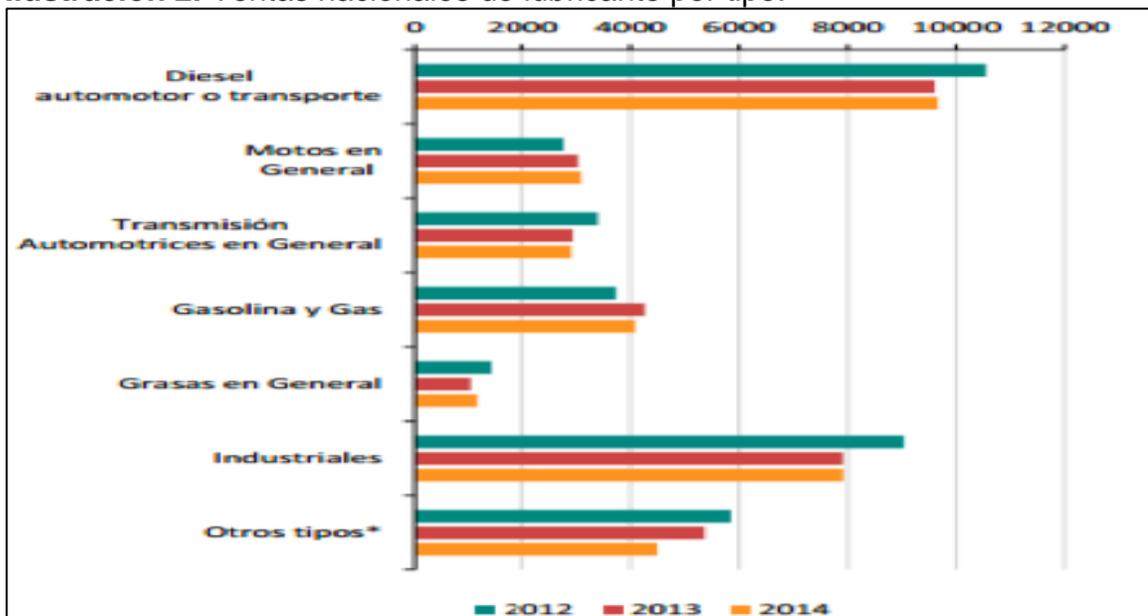


Fuente: SERNA, Marylin y BARRERA, Isabel. Trabajo de grado gerencia de ventas. [En línea]. Trabajo de grado. Universidad Externado, Bogotá D.C.: 2017. [Consultado 01, Marzo, 2019]. Disponible en: https://bdigital.uexternado.edu.co/bitstream/001/411/1/AEA-spa-2017-Plan_y_estructura_de_Ventas_Global_O%C3%ADI_aceites_y_lubricantes.pdf

³⁰ SERNA, Marylin y BARRERA, Isabel. Trabajo de grado gerencia de ventas. [En línea]. Trabajo de grado. Universidad Externado, Bogotá D.C.: 2017. [Consultado 01, Marzo, 2019]. Disponible en: https://bdigital.uexternado.edu.co/bitstream/001/411/1/AEA-spa-2017-Plan_y_estructura_de_Ventas_Global_O%C3%ADI_aceites_y_lubricantes.pdf

Para los años 2012, 2013 y 2014 el sector automotor es el mayor demandante de aceites lubricantes en Colombia, seguido del sector industrial. Las ventas nacionales de aceites lubricantes en barriles por año se pueden observar en la ilustración 2.

Ilustración 2. Ventas nacionales de lubricante por tipo.



Fuente: SERNA, Marylin y BARRERA, Isabel. Trabajo de grado gerencia de ventas. [En línea]. Trabajo de grado. Universidad Externado, Bogotá D.C.: 2017. [Consultado 01, Marzo, 2019]. Disponible en: https://bdigital.uexternado.edu.co/bitstream/001/411/1/AEA-spa-2017-Plan_y_estructura_de_Ventas_Global_O%C3%ADI_aceites_y_lubricantes.pdf

Los aceites lubricantes del segmento industrial son usados en aplicaciones donde las condiciones de presión y temperatura son extremas, por ende, poseen una mezcla de aditivos para garantizar su buen desempeño. Los lubricantes de proceso son utilizados ampliamente en el curtido de pieles, manufactura de cosméticos, para la industria textil, piezas de cerámica, entre otros.

Por último, el segmento automotor contiene todos los aceites de lubricación, de transmisión y los usados en motores estacionarios³¹.

1.1.5 Usos y aplicaciones de los aceites lubricantes. Los aceites lubricantes están diseñados para mantener los equipos con buena calidad, eficiencia y confiabilidad, por ello las aplicaciones industriales más comunes son³²:

³¹ REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Op. Cit., p. 15.

³² MOBIL INDUSTRIAL. Lubricantes industriales por aplicación. [Sitio WEB]. Colombia. La entidad. [05, septiembre, 2019]. Disponible en: <https://www.mobil.com.mx/es-mx/industrial/lubricants/applications>

- Compresores de aire
- Cojinetes
- Motores a Gas
- Engranés
- Hidráulicos
- Turbinas

1.1.6 Clasificación de los aceites lubricantes para motor. El sector automotor es uno de los principales consumidores de aceites lubricantes en el país, además de los aceites lubricantes usados en los motores de combustión existen otros tipos por eso es necesario clasificar los aceites lubricantes de motor. Para ello existen dos tipos de sistemas principales de clasificación.

1.1.6.1 Sistema de clasificación de viscosidad SAE. Encasilla los aceites dependiendo de su viscosidad a 100°C y diversas temperaturas por debajo. A temperaturas elevadas la viscosidad se relaciona con propiedades de desgaste o consumo y a temperaturas bajas la viscosidad pronostica el comportamiento cuando se trabaja en condiciones de arranque en frío³³.

1.1.6.2 Sistema de clasificación API. Clasifica los aceites dependiendo su comportamiento en diversos motores a condiciones controladas. El Instituto Americano de Petróleo realiza una descripción simple de los aceites lubricantes de motor con el fin de facilitar la tarea de rotulado, al igual que para elegir el aceite apropiado para cada caso³⁴.

1.2 ACEITES LUBRICANTES USADOS

Los aceites lubricantes usados (ALU) son identificados como residuos peligrosos debió a los contaminantes que contienen entre ellos los más importantes son los Bifenilos Policlorados y los halogenuros totales que son considerados como cancerígenos³⁵. Los aceites usados provienen principalmente de parte de la industria automotriz, como en los talleres de reparaciones de automóviles, estaciones de servicio, talleres de cambio de aceite, entre otros. En Colombia las industrias que utilizan y por ende generan mayor cantidad de aceites usados son: alimentos, productos de cemento y minería, química, construcción de maquinarias, metalúrgica, textil, productoras de energía eléctrica y electrónica, vidrio, entre otras³⁶.

³³ AGUDELO LÓPEZ, Sebastián y HERNÁNDEZ BAENA, Diego Andrés. Op. Cit., p. 30.

³⁴ AGUDELO LÓPEZ, Sebastián y HERNÁNDEZ BAENA, Diego Andrés. Op. Cit., p. 32.

³⁵ COLOMBIA. CONGRESO DE LA REPUBLICA. Op. Cit., p. 1.

³⁶ REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Op. Cit., p. 18.

1.2.1 Contaminantes de los aceites lubricantes usados. Los aceites lubricantes adquieren contaminantes a lo largo de su vida útil debidos procesos de oxidación, combustión y desgaste que atraviesan durante el tiempo de servicio. Dichos productos aceleran el envejecimiento y provocan fallas en el funcionamiento óptimo del lubricante, los principales compuestos contaminantes presentes en los aceites lubricantes usados se evidencian en el cuadro 1.

Cuadro 1. Contaminantes de los aceites usados según su origen.

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

Cuadro 1. (Continuación)

Componente	Origen
Azufre	Base lubricante – productos de la combustión

Fuente: REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Manual técnico para el manejo de aceites lubricantes usados de origen automotor e industrial. [Sitio WEB]. Bogotá D.C: 2014. La entidad. [11, septiembre, 2018]. Disponible en:

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

Existen dos contaminantes que no se encuentran en la tabla, pero son de gran relevancia a la hora de hablar de impurezas presentes en el aceite lubricante usado, ya que este fue considerado un residuo peligroso gracias a la presencia de estas sustancias.

1.2.1.1 Bifenilos Policlorados. Los Bifenilos Policlorados son compuestos organoclorados, estos pueden ser resinosos, sólidos, o líquidos aceitosos. Gracias al cloro son muy estables y su degradación no es fácil, no son hidrolizables ni solubles en agua, pero en solventes orgánicos sí. Existen tres fenómenos para la concentración de los PCBs: bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación³⁷.

Los Bifenilos son considerados peligrosos debido a la toxicidad de este compuesto, sus efectos pueden llegar desde un sarpullido y comezón hasta el desarrollo de un cáncer, dependiendo de la concentración³⁸.

1.2.1.2 Halógenos Totales. Los Halógenos constituyen una familia de elementos como lo son el flúor, cloro, yodo y estaño, estos elementos tienen similitudes en sus propiedades químicas, gracias a la disposición de siete electrones en la órbita externa de la estructura atómica de cada uno de los elementos³⁹.

La toxicidad de estos elementos depende de la concentración a la que es expuesta, puede llegar de un ahogo, tos, opresión torácica, aunque también puede llegar a un edema pulmonar que puede llegar a ser mortal⁴⁰.

³⁷ REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Op. Cit., p. 19.

³⁸ *Ibíd.*, p. 23.

³⁹ ENCICLOPEDIA DE SALUD Y SEGURIDAD EN EL TRABAJO. PROPIEDADES DE LOS HALOGENOS Y SUS COMPUESTOS. [Consultado el Marzo, 2019]. Disponible en: http://www.mitramiss.gob.es/es/publica/pub_electronicas/destacadas/enciclo/general/contenido/tomo4/104-07.pdf

⁴⁰ *Ibíd.*, p. 2.

1.2.2 Características fisicoquímicas de los aceites usados. Las características físicas y químicas de los aceites lubricantes varían a medida que este se va desgastando, ya que se acumulan compuestos contaminantes que hacen que los aceites pierdan las propiedades originales. Las características típicas de los aceites usados se ven plasmadas en la Tabla 4.

Tabla 3. Características típicas de los aceites usados.

Característica	Automotriz
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: REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Manual técnico para el manejo de aceites lubricantes usados de origen automotor e industrial. [Sitio WEB]. Bogotá D.C: 2014. La entidad. [11, septiembre, 2018]. Disponible en: <https://acp.com.co/web2017/images/pdf/combustiblesylubricantes/FAU/Manual-AU-final-14.pdf>.

1.2.3 Usos no adecuados de los aceites usados. Actualmente a nivel Colombia existen prácticas inadecuadas implementadas para la disposición de los aceites lubricantes usados⁴¹; dichas practicas traen consigo consecuencias negativas las cuales se presentan en el cuadro 2.

⁴¹ REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Op. Cit., p. 19.

Cuadro 2. Consecuencias del mal uso de los aceites lubricantes usados.

Usos no adecuados de los aceites lubricantes usados	Consecuencia
Impermeabilización de suelos	No filtración de agua
Vertido al suelo, fuentes de agua, alcantarillado y sistemas de drenaje	Contaminación de fuentes hídricas, que serán aún más difíciles de tratar
Control de maleza	Muerte de plantas
Mezclas de plaguicidas	Contaminación cruzada en cultivos
Mezclas con solventes	Peligro para el consumidor ya que no es un disolvente nuevo
Mezclas con aceites dieléctricos contaminados con PCB	Los PCBs son contaminantes tóxicos y difíciles de tratar
Combustibles cielo abierto y combustiones no controlados	Contaminación por CO ₂ y material particulado.

Fuente: REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Manual técnico para el manejo de aceites lubricantes usados de origen automotor e industrial. [Sitio WEB]. Bogotá D.C: 2014. La entidad. [11, septiembre, 2018]. Disponible en:
<https://acp.com.co/web2017/images/pdf/combustiblesylubricantes/FAU/Manual-AU-final-14.pdf>.

1.2.4 Efectos ambientales de los contaminantes presentes en los aceites usados. El aceite lubricante usado tiene muchas características de su estado original, como los hidrocarburos alifáticos de cadena línea e hidrocarburos policíclicos aromáticos; estos tienen propiedades parecidas a las del benceno. Debido a las altas temperaturas y presiones a las que son sometidos estos aceites en los motores se generan una serie de contaminantes como lo son los metales pesados como aluminio, manganeso, níquel, cobre, provenientes de las partes del

motor desgastado⁴². Una fracción del aceite usado es liberado al ambiente por el escape del motor, también puede entrar al agua o al suelo dependiendo la disposición final que se le dé; puede llegar al ambiente como consecuencia de su mala disposición⁴³. En el cuadro 3 se muestran los efectos ambientales sobre los principales recursos naturales debido al mal manejo de los aceites lubricantes de desecho.

Cuadro 3. Efectos ambientales derivados del mal manejo de los aceites usados.

Recurso	Efecto
Agua	Los aceites lubricantes usados desfavorecen la transferencia de oxígeno en los organismos presentes en los cauces de agua, produciendo efectos tóxicos sobre estos, debido a que forma una película sobre la superficie del cuerpo del agua.
Suelo	Al estar en contacto con el suelo los aceites lubricantes usados dañan el humus vegetal, generando alto riesgo de contaminación de aguas subterráneas y superficiales y alterando la fertilidad del suelo.
Aire	Cuando el aceite lubricante usado es quemado sin control puede emitir la más alta cantidad de plomo al aire que cualquier otra fuente industrial. Al contener compuestos aromáticos policíclicos cuando se descomponen en gases o en pequeñas partículas, estos se incorporan a su vez en la atmosfera.

Fuente: REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Manual técnico para el manejo de aceites lubricantes usados de origen automotor e industrial. [Sitio WEB]. Bogotá D.C: 2014. La entidad. [11, septiembre, 2018]. Disponible en: <https://acp.com.co/web2017/images/pdf/combustiblesylubricantes/FAU/Manual-AU-final-14.pdf>.

⁴² REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Op. Cit., p. 56.

⁴³ *Ibíd.*, p. 57

1.2.5 Efectos en la salud de los contaminantes de los aceites lubricantes usados. Existen muchos efectos a la salud asociados con los mayores contaminantes de estos aceites, esto dependerá de la concentración, el tiempo de exposición y a la manera de cómo se entró en contacto con estos, los efectos se describen a continuación.

Cuadro 4. Efectos sobre la salud de los contaminantes presentes en el ALU.

Contaminante	Efecto en la salud
Plomo	El plomo es un contaminante altamente toxico debido a que puede afectar casia cualquier órgano y sistema del cuerpo, en este caso el más sensible es el sistema nervioso. La exposición prolongada a este contaminante puede causar deterioro en las funciones principales del sistema nervioso, puede producir debilidad en dedos, muñecas y tobillos, aumento en la presión sanguínea y anemia. A niveles altos de exposición puede causar daños serios en el cerebro y riñones, causa en mujeres embarazadas abortos espontáneos y puede hasta causar la muerte.
Cromo	Debido a la inhalación de niveles altos de este contaminante, el cromo puede producir revestimiento interno de la nariz, secreción nasal, úlceras nasales y problemas respiratorios como asma, respiración jadeada y falta de aliento.
Aluminio	Generalmente este contaminante no genera riesgos para la salud, sin embargo, si se es expuesto a altas cantidades puede generar enfermedades graves debido al excesos del aluminio como problemas de cebero o huesos.
Nitrobenceno	A altas concentraciones el nitrobenceno puede producir metahemoglobinemia que es la incapacidad de transportar oxígeno en la sangre, también puede dañar el hígado y a bajos niveles puede generar dolor de cabeza, debilidad, somnolencia e irritación en piel ojos.
Cobre	A altos niveles de cromo puede producir irritaciones en la garganta y la nariz.
Zinc	Al respirar altas cantidades de polvos y vapores de zinc puede producir una enfermedad llamada fiebre de vapores de metal que es de corta duración.
Cloro	El cloro a niveles bajos puede producir irritación de garganta, nariz y ojos, en altas cantidades puede producir alteraciones del ritmo respiratorio y daño de los pulmones.

Cuadro 4. (Continuación)

Contaminante	Efecto en la salud
Bifenilos Policlorados (PCBs)	A niveles bajos de este contaminante puede tener efectos como salpullidos o piel con acné, también alteraciones en la sangre y orina lo cual indicaría enfermedades al hígado. Cuando los Bifenilos Policlorados se mezclan con plaguicidas puede haber alteraciones significativamente graves para la salud.

Fuente: REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Manual técnico para el manejo de aceites lubricantes usados de origen automotor e industrial. [Sitio WEB]. Bogotá D.C: 2014. La entidad. [11, septiembre, 2018]. Disponible en: <https://acp.com.co/web2017/images/pdf/combustiblesylubricantes/FAU/Manual-AU-final-14.pdf>.

1.2.6 Tratamiento de los aceites usados. Existen una serie de operaciones unitarias a las cuales los aceites usados pueden ser sometidos con el fin de eliminar algunos contaminantes generados durante su uso. Los más comunes son⁴⁴:

- Sedimentación
- Calentamiento
- Centrifugación
- Demulsificación
- Filtración
- Destilación flash
- Adsorción e intercambio iónico

1.2.7 Tecnologías empleadas para el re-refinamiento de ALU. Actualmente existen diversas tecnologías que son empleadas en el tratamiento de los aceites lubricantes usados, dentro de las cuales se destacan:

⁴⁴Ibíd., p. 45.

Cuadro 5. Tecnologías empleadas para el re-refinamiento de los ALU.

Tecnología	Descripción
Proceso convencional Ácido – Arcilla	El aceite usado se calienta hasta 170 °C, para eliminar el agua y los compuestos volátiles. Se enfría hasta 30°C y se mezcla con ácido sulfúrico concentrado, para remover gran parte de los contaminantes en forma de lodo. Al aceite obtenido se le agrega arcilla para mejorar su color y niveles de acidez. Finalmente, se filtra para eliminar sólidos en suspensión.
Proceso KTI (Kinetics Technology International)	El aceite usado se deshidrata, se destila al vacío; extrayendo el aceite por el destilado y los contaminantes por los fondos de la torre. Se le agrega arcilla para aclararlo y se filtra para eliminar sólidos en suspensión.
Proceso Meinken	El aceite usado se deshidrata, para eliminar los contaminantes de bajo punto de ebullición. Se envía a una unidad de rompimiento térmico (termocracking), para eliminar los contaminantes. Por la parte superior de la unidad de termocracking, se obtiene el destilado (spindleoil). El spindleoil se trata con ácido sulfúrico, obteniendo un aceite ácido y un desecho ácido. El aceite ácido se envía a una unidad de vacío, para eliminar la fracción de gasoil. El aceite resultante, se envía a una unidad de filtración – neutralización, para obtener una base lubricante de alta calidad.

Cuadro 5. (Continuación)

Tecnología	Descripción
Extracción por solvente	Se mezcla el aceite usado con un solvente (2 – propanol, metil – etil – cetona o 1 – butanol). Se mantiene durante tres días en un tanque con poca agitación, con el fin de sedimentar las impurezas orgánicas. El aceite resultante se destila para recuperar el solvente y obtener un aceite re – refinado de alta pureza.

Fuente: REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Manual técnico para el manejo de aceites lubricantes usados de origen automotor e industrial. [Sitio WEB]. Bogotá D.C: 2014. La entidad. [11, septiembre, 2018]. Disponible en: <https://acp.com.co/web2017/images/pdf/combustiblesylubricantes/FAU/Manual-AU-final-14.pdf>.

1.2.8 Tratamientos biológicos para el aceite lubricante usado. En la actualidad no existen muchos estudios en los tratamientos biológicos para la recuperación de los aceites lubricantes debido a que todos estos están enfocados a la recuperación de lodos y suelos contaminados por aceites de motor usados.

Hace poco se realizó un estudio del tratamiento de los aceites lubricantes usado con bacterias sulfato reductoras para la disminución de contaminantes en donde logro aislamiento de dos cepas bacterianas (una de las cuales pertenece al género *Clostridium*), las cuales fueron aptas para la disminución de metales pesados y azufre que están presentes en el aceite lubricante de motor Diésel⁴⁵. A continuación, se muestra el cuadro de resultados que se obtuvieron después del tratamiento a los ALU.

⁴⁵ GUTIERREZ, David y PEREZ, Johana. 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. [En línea]. Tesis. Fundación Universidad de América, Bogotá D.C.: 2019. [Consultado 13, mayo, 2019]. Disponible en: <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7382/1/6131051-2019-1-IQ.pdf>

Ilustración 3. Resultados de experimentación.

	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: GUTIERREZ, David y PEREZ, Johana. 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. [En línea]. Tesis. Fundación Universidad de América, Bogotá D.C.: 2019. [Consultado 13, mayo, 2019]. Disponible en: <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7382/1/6131051-2019-1-IQ.pdf>

Como se observa en la figura anterior se realizó el tratamiento con dos cepas distintas y con una replicada de cada uno en donde se tomaron dos diferentes concentraciones de 50% y 75%; los valores que se muestran en negativo indican que la concentración de dichos contaminantes aumento en el tratamiento y los de valor positivo indican que la concentración de estos disminuye durante el tratamiento.

1.2.9 Aplicaciones del aceite lubricante usado tratado. A partir de procesos de tratamiento para los aceites lubricantes usados, estos se pueden utilizar como combustible alternativo en diversos procesos industriales, sustituyendo parcial o totalmente los combustibles comunes, también se puede utilizar como un combustible industrial similar al fueloil. Los procesos en los cuales se pueden utilizar y ser aprovechados son⁴⁶:

Co-procesamiento en plantas de fabricación de cemento: en la producción del cemento es necesario los hornos que demandan temperaturas altas para la transformación de materias primas que son altamente alcalinas, es por esto que los hornos son un escenario ideal para la recuperación energética de los aceites usados con emisiones que son permitidos al ambiente. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y los clorados se destruyen es por este motivo que no es necesario realizar un tratamiento anterior. En Colombia los Alas pueden utilizarse si los hornos contienen sistemas de reducción y detención de material particulado que sea altamente eficiente es decir mayor al 95%, pese a lo anterior si los aceites contienen Bifenilos Policlorados (PCB) o Terfenilos Policlorados (PCT) concentraciones

⁴⁶ REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Op. Cit., p. 61.

mayores a 50 ppm y halógenos totales (expresado como HCl) en concentraciones mayores a 1.000 ppm no podrán ser utilizados⁴⁷.

Utilización de combustible industrial: en Colombia se pueden utilizar los aceites usados previamente tratados con mezcla de otros combustibles, teniendo en cuenta los porcentajes máximos permitidos de contaminantes y de mezclas. Es importante realizar una caracterización de los aceites usados mediante los parámetros que estable la resolución 1446 de 2005 del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial⁴⁸.

1.2.10 Requerimientos y condiciones para clasificación de aceites re-refinados según la NTC 5995 y la resolución 1446 de 2005 del ministerio de medio ambiente. A continuación, se muestran todos y cada uno de los requerimientos necesarios luego de un tratamiento para catalogar un aceite lubricante “re-refinado”

Ilustración 4. Requisitos de las bases lubricantes re-refinadas.

Característica	Base Tipo A (Neutro Liviana)	Base Tipo B (Neutro Media)	Base Tipo C (Neutro Pesada)
Apariencia	Claro, brillante	Claro, brillante	Claro, brillante
Color ASTM, máx.	3,0	4,0	4,5
Viscosidad Cinemática a 40 °C, cSt	10,0 – 32,0	32,1 – 76,0	76,1 - 151
Viscosidad Cinemática a 100 °C, cSt	Reportar	Reportar	Reportar
Índice de Viscosidad, mín	95	95	95
Punto de Inflamación, °C, mín	190	190	190
Punto de Fluidez, °C, máx	-3	-3	-3
Índice de Acidez Total, mg KOH/g, máx	0,05	0,05	0,05
Cenizas, % peso, máx	0,02	0,02	0,02
Residuo de Carbón Conradson, % peso, máx	0,3	0,3	0,3
Corrosión al Cobre, 3 h a 100 °C, máx	1	1	1
Contenido de azufre	Véase la Tabla 1		
Metales de aditivos (Ca, Mg, Zn), ppm, total máx	15	15	15
Contenido de fósforo (P), máx	15	15	15
Otros elementos contaminantes (Cadmio, Cromo, Arsénico, Níquel, Estaño, Bario Hierro, Cobre, Silicio, Aluminio, Plomo, Vanadio), ppm, total máx	50	50	50
PCB's, ppm, máx	5	5	5

Fuente: INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Petróleo y sus derivados. bases lubricantes re-refinadas. NTC 5995. Bogotá D.C.: La entidad, 2013. p. 8.

⁴⁷ *Ibíd.*, p. 62.

⁴⁸ *Ibíd.*, p. 62.

Ilustración 5. Tabla de porcentajes para mezcla y límites máximos de contaminantes en aceites usados tratados.

Contaminante	Máxima concentración de contaminante (ppm)	
	Para mezcla hasta del 40%	Para mezcla hasta del 80%
PCB`s	15	5
Halógenos orgánicos totales (como HCl)	650	400
Halógenos totales (Como HCl)	800	500
Cadmio	2	1
Cromo	8	3
Plomo	50	10
Arsénico	2	1
Níquel	1.5	1
Zinc	120	60
Estaño	5	3
Bario	3	1
Punto de chispa (°F, valor mínimo)	> 170	> 170

Fuente: REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Resolución 1446 (09, 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: Congreso de la República de Colombia. Bogotá D.C. 2005. 3 p.

Como se puede observar en las ilustraciones 4 y 5 las bases lubricantes solo pueden ser consideradas como re-refinadas si y solo si cumplen con dichos parámetros.

1.3 PROCESO MICROBIOLÓGICO

1.3.1. Medio de cultivo. Se denomina medio de cultivo al material alimenticio donde crece el microorganismo⁴⁹ y está diseñado para fomentar el crecimiento bacteriano en el tiempo de incubación. Todas las bacterias en general tienen requisitos nutricionales indispensables para su crecimiento, necesitan como mínimo una fuente de energía, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales,

⁴⁹ GONZALEZ, María; ANGITA, María y TORRICO, Gertrudis. Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología.[En línea]. 2012. p. 42.

oligoelementos y agua⁵⁰. Sin embargo, en algunos casos dependiendo la bacteria el medio de cultivo necesita sustancias adicionales para que exista crecimiento, estas pueden ser vitaminas, factores esenciales, aminoácidos entre otras⁵¹.

1.3.1.1 Tipos básicos de medios de cultivo. Los medios de cultivo en microbiología se pueden clasificar según tres factores importantes.

- **Según su estado físico:** La manera más sencilla y común de clasificar los medios de cultivo es según su estado físico o consistencia, de allí surgen los llamados medios sólidos y medios líquidos o caldos. Para ambos casos la cantidad de nutrientes debe ser significativa para facilitar el crecimiento de la bacteria, la diferencia reside en la adición de una sustancia llamada Agar que se encarga de darle consistencia al medio, es decir, solidificarlo⁵².

Generalmente en los medios de cultivo líquidos el crecimiento bacteriano es mayor debido a que las sustancias nutritivas están disueltas en el caldo y esto hace que exista una mayor disponibilidad de nutrientes para los microorganismos. Sin embargo, a la hora de manipular o disponer de las colonias el medio de cultivo sólido permite hacerlo con mayor facilidad⁵³.

- **Según su composición:** Dependiendo las sustancias que formen parte de su composición, los medios de cultivo pueden ser clasificados en:

Medios complejos: preparados generalmente a partir de tejidos animales y en algunos casos vegetales, su composición no está definida por lo tanto no es rigurosamente constante. Estos medios tienen inconvenientes a la hora de realizar experimentos donde la reproductibilidad debe ser exacta⁵⁴.

Medios sintéticos: son aquellos que basan su composición en sustancias químicas habitualmente disueltas en agua destilada en determinadas proporciones, por ende, es un medio de composición definida perfectamente⁵⁵.

Medios semisintéticos: en algunos casos la fabricación de medios de cultivo sintéticos se torna compleja o costosa, en estos casos se adicionan factores de

⁵⁰ OLMOS, Ana; GARCÍA, Celia; SAÉZ, Nieto y VALDEZATE, Sylvia. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología. España. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2010, 4 p. ISBN 978-84-614-7932-

⁵¹ *Ibíd.*, p. 5.

⁵² *Ibíd.*, p.9.

⁵³ *Ibíd.*, p.5.

⁵⁴ *Ibíd.*, p. 12.

⁵⁵ *Ibíd.*, p. 12.

crecimiento bajo la forma de un extracto orgánico complejo (extracto de levadura, extracto de tejidos, etc.)⁵⁶.

1.3.2 Esterilización. Consiente en la eliminación o muerte de microorganismos que están presentes en diversas sustancias u objetos, generalmente se realiza la esterilización de tal forma que no se contaminen reiteradamente. Existen diversos métodos para la esterilización como los agentes químicos como por ejemplo los aldehídos, óxido de etileno, cloro, compuestos clorados, compuestos fenólicos, ácidos y álcalis y agentes físicos como el calor seco, calor húmedo y radiaciones⁵⁷.

1.3.2.1 Métodos de Esterilización.

Cuadro 6. Métodos, fuentes y tipos de agentes esterilizantes en Microbiología.

Método	Fuente	Tipos
Calor Seco	Acción directa de la llama	Esterilización al rojo
		Flameado
		Incineración
	Acción directa por generador de calor	Estufa de calor seco
Calor Húmedo	Acción de agua caliente	Baño de maría hirviente
		Calentamiento repetido
		Ebullición directa
	Acción de vapor	Autoclave
Radiación	Ionizantes	Rayos X
		Rayos Gamma
	Ultravioleta	UV 260nm ADN/ARN
UV 280 nm-230nm Proteínas		
Filtración	Filtros	Filtros de diferentes composiciones, tamaño de poro y estructura

Fuente: ROJAS TRIVIÑO, Alberto. Conceptos y practicas de Microbiología general ; Palmira. [En línea]. Manual. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Valle.: [Consultado 28, marzo, 2019]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>

1.3.3 Siembra de Microorganismos. Se le conoce siembra al proceso de colocar microorganismos en medios de cultivo, las muestras para este cultivo pueden

⁵⁶ Ibíd., p. 12.

⁵⁷ ROJAS TRIVIÑO, Alberto. Conceptos y practicas de Microbiología general ; Palmira. [En línea]. Manual. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Valle.: [Consultado 28, marzo, 2019]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>

provenir de diferentes fuentes como muestras biológicas, control de calidad de algún producto, calidad de agua, de un cultivo microbiano a otro entre otros.⁵⁸

1.3.3.1 Técnicas de Siembra en Cajas de Petri.

- **Técnicas de siembra en Caja de Petri:** Método indicado en el aislamiento de colonias, con esta técnica lo que se busca es realizar una separación de la colonia del inóculo⁵⁹.
- **Técnicas de siembra en Caja de Petri en cuadrantes:** Esta técnica tiene como objeto diluir el inóculo a medida que se realicen estrías en el Agar nutritivo; se efectúa la siembra en cuatro cuadrantes esparciendo en cada uno de ellos la muestra⁶⁰.
- **Técnicas de Siembra en Caja de Petri en siembra masiva:** Consisten en incrementar la cantidad de inóculo en Agar nutritivo con el fin de obtener número alto de microorganismos⁶¹.
- **Técnicas de Siembra en Caja de Petri por punción:** Es utilizado para observar el crecimiento de subcultivos, cultivos inactivados o el crecimiento de hongos para luego realizar la identificación⁶².

1.3.3.2 Técnicas de Siembra en medios contenidos en tubos.

- **Siembra en tubos por estría simple:** Se realiza con inclinación del tubo y con Agar haciendo una marca de estría⁶³.
- **Siembra mixta en tubos:** Se realiza por medio de una picadura, inclinando tubo y bajando hasta la estría encima del Agar, el asa con la que se lleva la muestra es necesario dejarla dentro del tubo⁶⁴.
- **Siembra en tubos por picadura:** Se realiza en el centro del tubo en forma de picazón hasta el fondo del tubo⁶⁵.
- **Siembra en tubos en medio líquido:** Ideal para transferir medio líquido a líquido o sólido a líquido⁶⁶.

⁵⁸ *Ibíd.*, p. 49.

⁵⁹ *Ibíd.*, p.50.

⁶⁰ *Ibíd.*, p.50.

⁶¹ *Ibíd.*, p.51.

⁶² *Ibíd.*, p.51.

⁶³ *Ibíd.*, p.52.

⁶⁴ *Ibid.*, p.53.

⁶⁵ *Ibid.*, p.53.

⁶⁶ *Ibíd.*, p.53.

1.3.4 Condiciones generales para el cultivo. Existen factores que se deben tener en cuenta a la hora de llevar a cabo el cultivo ya que estos afectan directamente el crecimiento o desarrollo de los microorganismos en el medio de cultivo, y en algunos casos son ajenos al propio medio⁶⁷.

- Disponibilidad de nutrientes
- Consistencia del medio
- Presencia de oxígeno
- Condiciones de humedad
- Luz ambiental:
- pH
- Temperatura
- Esterilidad del medio

1.3.5 Identificación Microbiana. La identificación bacteriana se realiza habitualmente por técnicas convencionales basadas en la determinación de las características fenotípicas del microorganismo, debido a que la ejecución y coste son más accesibles. Los métodos fenotípicos cotidianos de identificación bacteriana se basan en determinar las características visibles de los microorganismos, como la morfología, desarrollo, propiedades metabólicas y propiedades bioquímicas. Para el cultivo es fundamental la elección adecuada del medio de cultivo y las condiciones de incubación⁶⁸. En el proceso habitual de identificación bacteriana se establecen tres niveles:

- En primer lugar, se opta por aquellas pruebas que se denominan primarias, son fáciles y rápidas de realizar; entre estas se encuentra la morfología, la coloración de Gram u otras tinciones, crecimiento en varios tipos de medio, crecimiento en diversas atmosferas de inhibición, entre otras. Haciendo uso de estas pruebas es posible clasificar las bacterias de forma provisional en los grupos principales. Posterior a ello se escogen técnicas con mayor discriminación debida a que muchos microorganismos pueden evidencias características o aspecto similar⁶⁹.
- En segunda instancia se debe especificar el género correspondiente al microorganismo, al igual que en el nivel anterior la identificación se basa en las características del cultivo y pruebas primarias que permiten definir el género, grupo de géneros o familia dependiendo el caso. Dichas pruebas son: coloración de Gram, catalasa, oxidasa, morfología, oxidación-fermentación, producción de esporas, fermentación de glucosa, movilidad, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis⁷⁰.

⁶⁷ GONZALEZ, María; ANGITA, María y TORRICO, Gertrudis. Op. Cit., p.4.

⁶⁸ OLMOS, Ana; GARCÍA, Celia; SAÉZ, Nieto y VALDEZATE, Sylvia. Op. Cit., p.3

⁶⁹ OLMOS, Ana; GARCÍA, Celia; SAÉZ, Nieto y VALDEZATE, Sylvia. Op. Cit., p.4.

⁷⁰ *Ibíd.*, p.4.

- Finalmente debe realizarse la identificación a nivel de especie, para ello se emplean unas pruebas bioquímicas determinadas que generan un alto grado de precisión para la mayoría de bacterias. Los resultados se comparan con sistemas estandarizados basados en perfiles numéricos para la identificación.⁷¹

1.3.5.1 Características microscópicas. La evaluación microscópica luego de realizar la tinción revela características importantes como la forma, la manera de agruparse, el tamaño y la estructura de los microorganismos. Las coloraciones son el paso inicial para la identificación, dentro de las más usadas e indispensables están, azul de metileno y tinción de Gram; esto permite realizar un diagnóstico provisional para la mayoría de bacterias. Estos son algunos de los términos usados para la descripción de las características.⁷²

- Tinción: uniforme, irregular, bipolar, unipolar
- Forma: bacilos, cocos, cocobacilos, filamentos
- Capsula: presente o ausente
- Endosporas: ovales, esféricas, subterminales, terminales
- Tamaño: cortos, largos
- Disposición: parejas, cadenas, tétradas, racimos
- Extremos: redondeados, puntiagudos
- Bordes laterales: abultados, paralelos, cóncavos, irregulares

1.3.5.2 Características macroscópicas. La característica macroscópica más importante de destacar es la Morfología. La morfología de las colonias es una característica esencial para la identificación y diferenciación inicial de los microorganismos, para el análisis morfológico es mejor evaluar colonias de cultivos frescos en medio no selectivos. Para este tipo de identificación es fundamental el aislamiento de las bacterias ya que el cultivo debería estar conformado por solo un tipo de microorganismo y procedente de una célula única⁷³.

Cuando colonias bacterianas de una única especie crecen en medios y condiciones específicas e idóneas, estas se describen bajo características básicas, tamaño, forma, consistencia, y en algunos casos el color. El tamaño es similar o uniforme en colonias de la misma especie, la textura puede ser seca o viscosa, la forma está dada por el borde y el grosor de la colonia y algunas bacterias producen pigmentos característicos que ayudan en el proceso de identificación⁷⁴

⁷¹ Ibid., p.4

⁷² Ibid., p.4

⁷³ OLMOS, Ana; GARCÍA, Celia; SAÉZ, Nieto y VALDEZATE, Sylvia.Op. Cit., p.4.

⁷⁴ Ibid., p.5.

1.4 BIODEGRADACIÓN DE LOS BIFENILOS POLICLORADOS

Los BPCs con un conjunto de compuestos que se producen comercialmente a partir de la cloración progresiva de cloruro férrico y/o yoduro férrico⁷⁵. Estos a su vez se pueden obtener por diversas vías como lo son las reacciones de condensación de arilo, la sustitución directa sobre un sistema de bifenilo desarrollado y por fenilación de sustratos aromáticos⁷⁶. Uno de los tratamientos que se utilizan para la disminución de los Bifenilos Policlorados en el ambiente es la biodegradación; esta se define como la actividad de un sistema biológico sobre una sustancia por lo cual es modificada la estructura de la misma. La biodegradación de los BPCs se da por dos procesos: aerobio y anaerobio⁷⁷.

1.4.1 Biodegradación aerobia de los Bifenilos Policlorados a partir de bacterias. El estudio. Las bacterias han sido utilizadas en mayor medida que los hongos para la degradación de los BPCs, es esta se incluyen varios cultivos mixtos y cepas puras como lo son *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, entre otros.

Los microorganismos aerobios atacan oxidativamente a los Bifenilos rompiendo el anillo y destruyendo los compuestos, además se ha demostrado que mediante algunas reacciones bioquímicas las enzimas involucradas en estos procesos de degradación, generan un fraccionamiento isotópico del carbono e hidrógeno⁷⁸.

Generalmente en este proceso aeróbico los Bifenilos que son altamente clorados son más difíciles de degradar. El grado de degradación depende de la estructura del sustrato y del microorganismo empleado, sin embargo, existen estudios los cuales atribuyen una serie de correlaciones⁷⁹:

- La velocidad de degradación de los PCBs disminuye con el aumento de la cloración en los anillos
- Cuando los PCBs tienen números diferentes en cada uno de sus anillos, generalmente se degradan los del anillo menos sustituido.
- Los BPCs con una sustitución 2,4'-dicloro son mayormente susceptibles al rompimiento del anillo en la posición meta y por ende hay una acumulación del metabolito ácido fenilhexadienóico.
- Las posiciones 2,3 son sensibles a la oxidación y generan cis-2,3-dihidro-2,3-dihidroxi como metabolito intermediario

⁷⁵ Biodegradación de Bifenilos Policlorados (BPCs) por Microorganismos: *Investigación científica*. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México. Acta Universitaria, Vol. 15 No. 5-2005. ISSN 0188-6266.

⁷⁶ *Ibíd.*, p. 22

⁷⁷ *Ibíd.*, p. 22.

⁷⁸ *Ibíd.*, p. 22.

⁷⁹ *Ibíd.*, p. 22.

- Los congéneres en diversos casos con 2 y/o 3 posiciones sustituidas en ambos anillos no son realmente sensibles a la degradación metabólica
- El metabolismo para cada BPC es diferente para cada tipo de microorganismo.

Inicialmente las bacterias atacan a los BPCs con adición de O₂ a la posición 2,3 mediante una enzima dioxigenasa, posterior a esto se da una deshidrogenación a catecol seguido con un rompimiento del anillo⁸⁰.

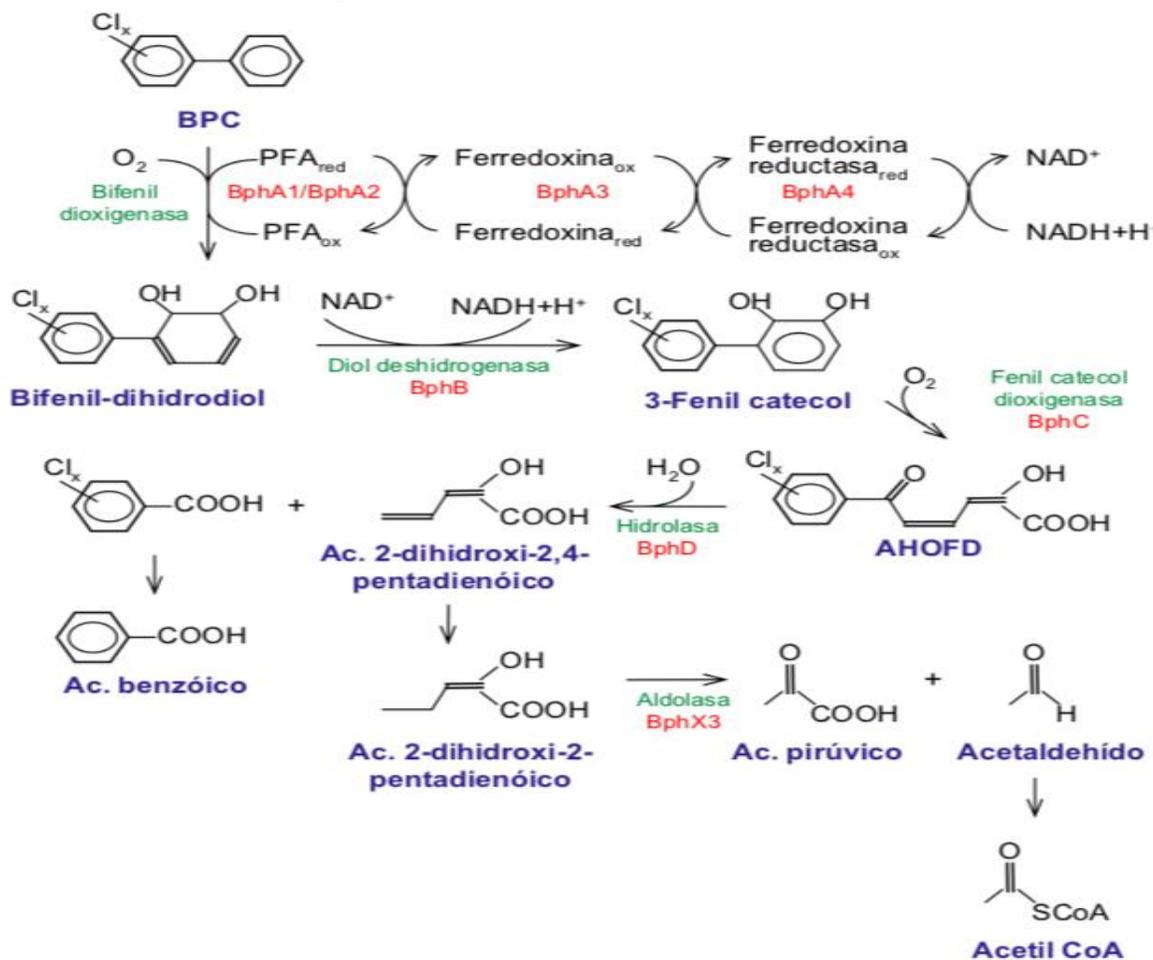
En primer lugar, la bifeniloxigenasa se interna en la posición del anillo 2,3, el cual es el anillo no clorado o el menos clorado del bifenilo, produciendo un cis-dihidrodiol. La bifenil dioxigenasa contiene una proteína fierro-azufre (PFA), que sirve para que interactúe con el sustrato y pueda ser incluido el oxígeno una ferredoxina y una ferredoxina reductasa.

Siguiendo la diol deshidrogenasa deshidrogena el dihidrodiol a 3-fenil catecol. El bifenil es dividido en la posición 1,2 por una fenil catecol dioxigenasa para generar ácido-2-hidroxi-6-oxo-6-fenil- hexa-2,4-dienóico (AHOFD). A continuación, una hidrolasa hidroliza al acido a acido benzoico y en ácido-2-hidroxi-2,4-pentadienóico; esto sigue hasta acetyl CoA por la acción de una hidratasa, una adolasa y una CoA acilasa⁸¹. La vía de degradación de los BPCs mediante bacterias se muestra en la siguiente ilustración.

⁸⁰ *Ibíd.*, p. 22.

⁸¹ *Ibíd.*, p. 22.

Ilustración 6. Vía de degradación de BPCs mediante bacterias.



Fuente: Biodegradación de Bifenilos Policlorados (BPCs) por Microorganismos: *Investigación científica*. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México. Acta Universitaria, Vol. 15 No. 5-2005. ISSN 0188-6266.

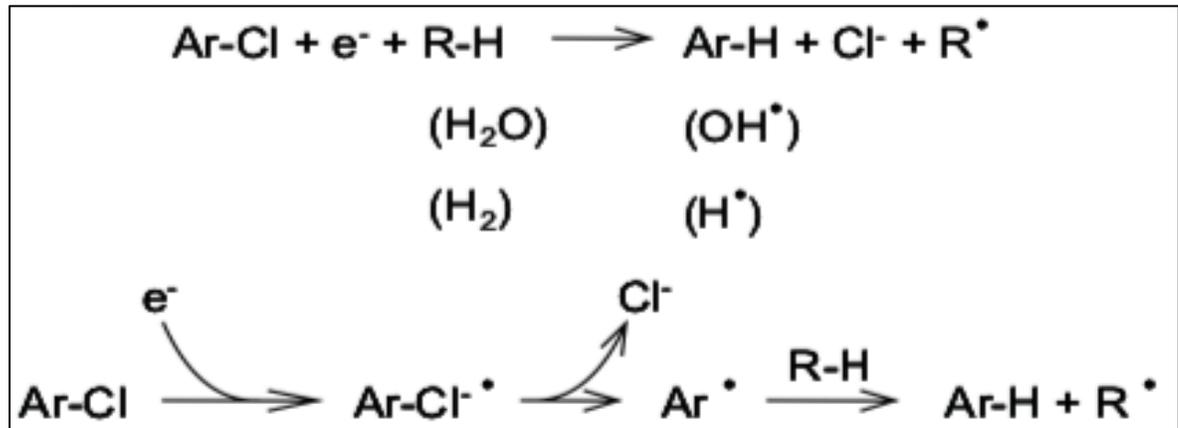
1.4.2 Biodegradación anaeróbica de los Bifenilos Policlorados a partir de bacterias. Existen cultivos mixtos los cuales han sido aislados para trabajar en la degradación de BPCs los cuales demostraron dechloraciones selectivas, sin embargo, ha sido muy complicado el aislamiento de los mismos⁸². El proceso con anaerobiosis se divide en dos categorías o, m, p-dechloraciones (reactividad de del congénere y dependiente del potencial de reducción) y m, p-dechloraciones (importante la forma molecular). En este proceso los Bifenilos actúan como donadores de electrones y el cloro es liberado como un subproducto; además no existe una destrucción del esqueleto carbona. A continuación, se muestran las ventajas de la dechloración reductiva:⁸³

⁸² *Ibíd.*, p. 23.

⁸³ *Ibíd.*, p. 24.

- El grado de cloración se vuelve más pequeña volviéndolos así más susceptible a la mineralización por microorganismos aerobios.
- Al liberar el cloro se reduce la toxicidad del compuesto.
- Cuando se realiza el tratamiento en *in situ* pueden establecerse más fácilmente. Los microorganismos anaerobios sustituyen al cloro por el hidrogeno y utilizan al cloro como aceptor final de electrones, involucrando la adición del electrón al enlace carbono-cloro y luego a la pérdida del hidrogeno. El compuesto por el cual se elimina el hidrógeno es desconocido⁸⁴.

Ilustración 7. Mecanismo de dechloración reductiva de BPCs catalizada por bacterias anaerobias.



Fuente: Biodegradación de Bifenilos Policlorados (BPCs) por Microorganismos: *Investigación científica*. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México. Acta Universitaria, Vol. 15 No. 5-2005. ISSN 0188-6266.

1.5 BIORREACTOR

Los biorreactores son equipos basados en un contenedor donde se lleva a cabo el proceso de cultivo de microorganismos, por ello, el biorreactor debe proporcionar las condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y garantizar la homogeneización de los constituyentes del sistema⁸⁵.

A la hora de pensar en el diseño de un biorreactor es preciso tener en cuenta aspectos importantes como:

- Debe contar con un sistema adecuado de aireación y agitación para abarcar las necesidades de los microorganismos.

⁸⁴ *Ibíd.*, p. 24.

⁸⁵ MORENO, Erika y VANEGAS, Daniel. Diseño y construcción de un biorreactor esterilizable y de bajo costo para el estudio de crecimiento de microorganismos. [En línea]. Tesis. Universidad Distrital Francisco José De Caldas, Bogotá D.C.: 2017. [Consultado 15, junio, 2019]. Disponible en: <http://repository.udistrital.edu.co/bitstream/11349/12989/1/VanegasGutierrezDanielFernando2018.pdf>

- A medida que se produce el crecimiento celular se debe mantener las condiciones de temperatura deseada.
- Las células deben estar distribuidas uniformemente en el volumen del medio.
- Fácil montaje y operación⁸⁶.

Adicional a esto, también se pueden encontrar diseños que requieran:

- El seguimiento de pH, concentración de oxígeno disuelto y suministro de nutrientes.
- Mantener la especie de cultivo aislada; una vez esté en funcionamiento el BR.
- Elección de materiales afines con las necesidades del diseño⁸⁷.

1.5.1 Método de operación o alimentación de los biorreactores. Los biorreactores con condiciones homogéneas debido a la agitación constante, se pueden catalogar según su modo de operación o método de alimentación en tres diferentes tipos: discontinuo (BATCH), semicontinuo (Fed-Batch) y continuo⁸⁸.

1.5.1.1 Batch. Son biorreactores sencillos de operar e industrialmente son utilizados para tratar pequeñas cantidades de sustancias, no tienen entrada ni salida de nutrientes o biomasa⁸⁹.

En el crecimiento de microbiano esto se refiere a que las células se cultivan en un recipiente con una concentración inicial y esta no se altera con ningún tipo de nutriente o lavado adicional, por tanto, el volumen se mantiene constante. Las principales características de este tipo de reactores son: la reacción se desarrolla en un sistema cerrado, todos los reactivos son cargados al reactor al inicio de la operación, al finalizar la operación la mezcla reactiva se descarga al mismo tiempo, operan en régimen inestable, entre otras⁹⁰.

El biorreactor tipo Batch cuenta con grandes ventajas, como, por ejemplo: su operación es sencilla, es más versátil que un reactor continuo y el coste inicial es menor que el de los reactores continuos. Sin embargo, también es importante tener en cuenta algunas desventajas como: el costo de operación es mayor que el de los reactores continuos, requiere un ciclo de operación complicado, entre otras⁹¹.

⁸⁶ *Ibíd.*, p. 15

⁸⁷ *Ibíd.*, p. 15.

⁸⁸ GUILERA, Javier. Diseño de un biorreactor para la obtención de Quitosan. [En línea]. Tesis. Escola Tècnica Superior d'Enginyers Industrials de Barcelona, Barcelona, España.: 2016. [Consultado 20, mayo, 2019]. Disponible en: https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/101139/TFG_Javier_Guilera_v.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

⁸⁹ MORENO, Erika y VANEGAS, Daniel. Op, Cit., p. 15.

⁹⁰ GUILERA, Javier. Op, Cit., p, 32.

⁹¹ *Ibíd.*, p. 33.

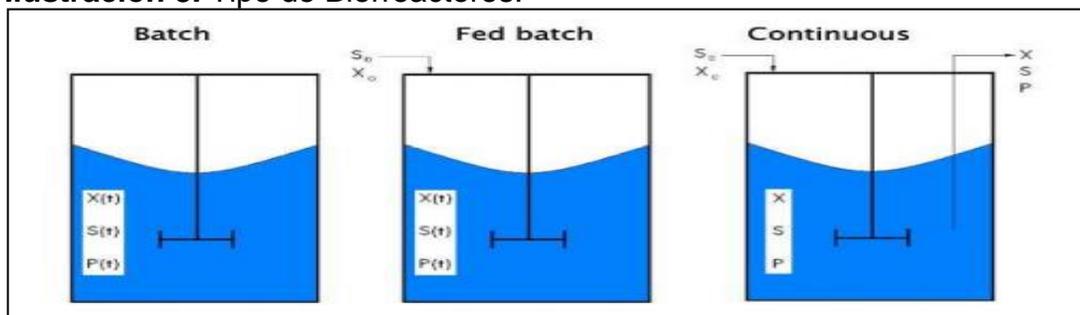
1.5.1.2 Fed-Batch. Este tipo de biorreactor se denomina discontinuo ya que la alimentación de nutrientes al cultivo se da de forma intermitente mientras no haya efluente en el sistema. Dependiendo de cuál sea el objetivo, la adición adquiere un papel importante ya que ayuda a obtener un mejor rendimiento en la fermentación⁹².

Estos sistemas son más flexibles, pero de más difícil análisis y operación que los anteriores; estos consisten en remover al “final” de la operación un 80 o 90% de la producción de biomasa, la cual es restituida con una cantidad equivalente de medio de cultivo. Este proceso permite un “reinicio” con un inculo de gran tamaño y elimina la fase de adaptación del microorganismo al medio, lo que favorece la velocidad de crecimiento⁹³.

1.5.1.3 Continuo. Son ideales industrialmente cuando deben tratarse grandes cantidades de sustancia y permiten obtener un buen control de la calidad del producto. Tienen un flujo uniforme de entrada y salida de nutrientes, donde la alimentación debe ser consistente con la cantidad de nutrientes que son usados y a la vez extraídos del biorreactor. Estos sistemas no tienen sedimentación, y dentro de los más usados se encuentra el CSTR⁹⁴.

Un reactor CSTR es un tanque en el cual la masa reaccionante es continuamente agitada de tal manera que se considera como una mezcla completa y, por lo tanto, se asume que sus propiedades son uniformes en todo el interior del reactor⁹⁵.

Ilustración 8. Tipo de Biorreactores.



Fuente: GUILERA, Javier. Diseño de un biorreactor para la obtención de Quitosan. [En línea]. Tesis. Escola Tècnica Superior d'Enginyers Industrials de Barcelona, Barcelona, España.: 2016. [Consultado 20, mayo, 2019]. Disponible en: https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/101139/TFG_Javier_Guilera_v.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

⁹² *Ibíd.*, p. 34.

⁹³ MORENO, Erika y VANEGAS, Daniel. Op, Cit., p. 16.

⁹⁴ *Ibíd.*, p. 35.

⁹⁵ GUILERA, Javier. Op, Cit., p, 33.

1.5.2 Clasificación de los biorreactores. Los biorreactores pueden ser clasificados dependiendo su configuración y diseño, a continuación, se describen algunos de ellos⁹⁶

1.5.2.1 Biorreactor tubular. Fabricados generalmente con plástico o cristal, en forma tubular ya sea vertical, horizontal, cónico o serpentín; habitualmente estos operan al aire libre y la transferencia de O_2 CO_2 suele hacer sea partir de la inyección de aire, lo cual a su vez genera agitación⁹⁷.

1.5.2.2 Biorreactor tipo panel. Este tipo de biorreactor tiene una gran relación superficie-volumen, lo cual favorece el área superficial y así la captación de luz, por tal razón estos sistemas son usados especialmente para organismos fotoautótrofos⁹⁸.

1.5.2.3 Fotobiorreactor (FBR). Esta clase de biorreactor debe incorporar algún tipo de fuente de luz. Por tanto, estos sistemas son especializados para el cultivo de microorganismos fotoautótrofos. Son utilizados generalmente en el cultivo de microalgas, los Fotobiorreactor habitualmente introducen dióxido de carbono (CO_2) para mejorar el crecimiento en presencia de luz, agua, nutrientes⁹⁹.

1.5.2.4 Biorreactor air-lift. Consiste en un sistema de agitación neumática conformado por una columna dentro del contenedor, la cual facilita el intercambio de material gas-liquido mediante la entrada de CO_2 por la parte inferior a través de una cavidad. Son utilizados popularmente en la industria, en el tratamiento de aguas y en bioprocesos.

Este tipo de biorreactor es considerado de gran potencial, por su simplicidad mecánica, bajo daño celular, dispersión uniforme y su relativa facilidad de manejar condiciones axénicas. Sin embargo, no es tal empleado como debería debido al costo¹⁰⁰.

⁹⁶ MORENO, Erika y VANEGAS, Daniel. Op, Cit., p. 17.

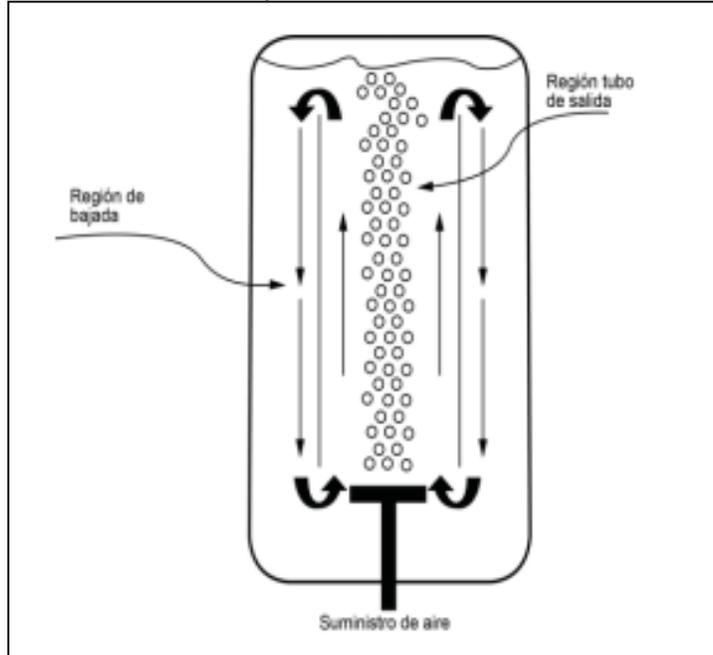
⁹⁷ *Ibíd.*, p. 17.

⁹⁸ *Ibíd.*, p. 17.

⁹⁹ *Ibíd.*, p. 17

¹⁰⁰ *Ibíd.*, p. 18.

Ilustración 9. Esquema de un reactor air-lift.



Fuente: GUILERA, Javier. Diseño de un biorreactor para la obtención de Quitosan. [En línea]. Tesis. Escola Tècnica Superior d'Enginyers Industrials de Barcelona, Barcelona, España.: 2016. [Consultado 20, mayo, 2019]. Disponible en: https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/101139/TFG_Javier_Guilera_v.pdf?sequence=1&isAllowed=y

1.5.3 Agitación en biorreactores. La correcta agitación del cultivo microbiano es esencial, la agitación es la operación que crea o que acelera el contacto entre dos o más fases¹⁰¹.

Este proceso acelera la relación entre los componentes del cultivo. Se caracteriza por mezclar las fases presentes en el biorreactor según corresponda, como, por ejemplo: una fase sólida constituida por las células microbianas, una fase gaseosa compuesta por el oxígeno cuando es necesario generar aireación y una fase líquida conformada por el agua y los nutrientes agregados¹⁰². Existen dos tipos de agitación las cuales se describen a continuación:

- **Neumática:** consienten la entrada de gas por medio de un tubo bien sea en la parte superior o inferior del biorreactor, este tipo de agitación no origina daños

¹⁰¹ GUILERA, Javier. Op, Cit., p, 33.

¹⁰² MORENO, Erika y VANEGAS, Daniel. Op, Cit., p. 18.

en las células lo que la hace especialmente adecuada para cultivo de microorganismos sensibles a la acción de cizalladora¹⁰³.

- **Mecánica:** Es principalmente diseñada para microorganismos cuya necesidad de oxígeno no es muy grande, posee elevados costos energéticos de transferencia de oxígeno¹⁰⁴.

1.5.4 Mezclado en biorreactores. Es un aspecto fundamental de un biorreactor puesto que proporciona condiciones homogéneas de absorción de nutrientes, oxígeno y luz cuando es necesario, mantener el equilibrio térmico y conseguir una dispersión de células uniforme, posibilitando el aumento de biomasa. En ciertos casos la agitación y el mezclado se puede brindar por el mismo sistema¹⁰⁵.

1.5.5 Variables de interés para un biorreactor. A la hora de evaluar el diseño y configuración de un biorreactor es indispensable analizar y establecer las siguientes variables:

1.5.5.1 Temperatura. La temperatura es uno de los requerimientos más importantes para el óptimo crecimiento de los microorganismos. Las bacterias generalmente crecen de forma idónea a una temperatura alrededor de los 37 °C, para las micro algas se encuentra entre los 20 y 24°C. Sin embargo, esta puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo, la especie y la cepa utilizada¹⁰⁶.

1.5.5.2 Nutrientes. Los requerimientos nutricionales son específicos para cada microorganismo, la nutrición consiste en suministrar los componentes químicos necesarios para el crecimiento. Algunos de los nutrientes se requieren en una mayor proporción que otros, a estos se les denomina macronutrientes y los usados en menor cantidad, micronutrientes¹⁰⁷.

1.5.5.3 Iluminación. Esta variable es exclusiva para los Fotobiorreactor, debido a que es esencial para acelerar el proceso de fotosíntesis y así un adecuado crecimiento. Esta puede ser suministrada desde una fuente natural o artificial. Existen aspectos importantes a tener en cuenta, como, por ejemplo: en ausencia de luz la biomasa puede decrecer, el mezclado del medio de cultivo tiene gran influencia en la absorción de luz, un exceso de intensidad lumínica puede mermar el crecimiento, entre otros¹⁰⁸.

¹⁰³ Ibid., p. 18.

¹⁰⁴ Ibid., p. 18.

¹⁰⁵ Ibid., p. 18.

¹⁰⁶ Ibid., p. 19.

¹⁰⁷ Ibid., p. 19.

¹⁰⁸ Ibid., p. 19.

1.5.5.4 pH. El pH intracelular de los microorganismos debe estar próximo a la neutralidad para evitar la desnaturalización de las macromoléculas que son sensibles a medios ácidos o básicos. Para el crecimiento de un microorganismo el pH específico, representa solo el pH extracelular. Por otro lado, el pH del cultivo está influenciado por varios factores como la producción de biomasa, la alcalinidad, composición iónica del medio de cultivo, la actividad microbiana autotrófica o heterotrófica y la eficiencia del sistema de adición de CO₂¹⁰⁹.

1.5.6 Materiales para la construcción de Biorreactores. Los materiales para la construcción de un BR son establecidos de acuerdo a las condiciones de operación a las que se somete, ofreciendo las características necesarias para su correcto funcionamiento. Algunas de estas propiedades son: alta fuerza mecánica, transparencia, carencia de toxicidad, estabilidad química, resistencia al desgaste, fácil de limpiar y bajo costo¹¹⁰.

1.5.7 Aplicaciones de Biorreactores. La implementación de los biorreactores ha resultado trascendental para la evolución de la biotecnología, debido al alto desarrollo de estos ha sido posible aplicarlos a los diferentes aspectos de interés de la industria. A continuación, se mencionan casos específicos para el uso de biorreactores en tratamientos con consorcios bacterianos¹¹¹.

- Biorreactor empleado para el tratamiento de aguas contaminadas con gasoil del puesto de isla de Toas mediante un consorcio microbiano.
- Implementación de un sistema combinado de un biorreactor de tanque agitado y uno de película fija para la remoción de índigo y surfactantes en agua residual industrial textil mediante un consorcio microbiano nativo con alta actividad catalítica.
- Utilización de un biorreactor air lif con soportes en PVC para el desarrollo de un consorcio bacteriano proveniente de efluentes mineros.

¹⁰⁹ *Ibíd.*, p. 19.

¹¹⁰ *Ibíd.*, p. 19.

¹¹¹ *Ibíd.* p. 20.

2. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL ACEITE LUBRICANTE USADO DE MOTOR DIESEL

En este capítulo se describen las características fisicoquímicas del aceite lubricante usado de motor Diésel, esto se llevó a cabo debido a que los aceites lubricantes adquieren sustancias contaminantes a lo largo de su vida útil las cuales hacen que se deteriore o pierda su funcionalidad, este análisis permite conocer el estado inicial en el que se encuentra el lubricante y compararlo con la normativa de los aceites lubricantes nuevos y usados para obtener así un punto de partida para la investigación.

2.1 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL ACEITE USADO DE MOTOR DIESEL

El Tecnoparque del Sena cuenta con diversas líneas de investigación las cuales están enfocadas al desarrollo y aprendizaje continuo, uno de estos es el Centro de Tecnologías del Transporte CTT, el cual presta servicios de capacitación y preparación de todo lo que abarca el sector automotriz, uno de estos es el mantenimiento de motores Diésel, el cual genera una serie de residuos de aceites usados, este será el aceite del cual se estará hablando durante toda la investigación. El objetivo de la investigación es la remoción de contaminantes puntualmente de los Bifenilos Policlorados y Halogenuros totales, por tal razón es necesario conocer las características fisicoquímicas y compararlas con las condiciones estándares de aceites nuevos y de los aceites reutilizados.

2.1.1 Muestreo del aceite lubricante usado. Este proceso se realizó bajo la norma NTC 5836-1: Manual de estándares de medición de petróleo, sección muestreo. Esta es la práctica normativa adecuada para el petróleo y sus derivados, la cual permite un proceso de muestreo, manipulación y almacenamiento apto para aceite lubricante usado.

Muestreo manual: La muestra debe ser almacenada en recipientes plásticos con tapa, que se deben mantener cerrados para evitar contaminación adicional y pérdida de material, al igual que protegidos de la luz y el calor ya que estos fomentan su desgaste y degradación. Si la muestra va a ser manipulada, debe ser homogeneizada antes para asegurar que la muestra transferida sea representativa.

Las muestras del aceite lubricante usado de motor diésel fueron suministradas por el Centro de Tecnologías del Transporte (CTT) del Sena, dicho aceite proviene de las actividades académicas desarrolladas por la línea de mecánica (mantenimiento de motores diésel) de este centro; el aceite suministrado corresponde a una mezcla de aceites lubricantes usados de motor diésel SAE 15W-40 de diferentes autos; al ser una muestra entregada por terceros, es considerada como muestreo simple.

2.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA INICIAL

A la hora de determinar las características fisicoquímicas del aceite lubricante de motor usado se tomó como base normas nacionales e internacionales, la Norma Técnica Colombiana (NTC) y la American Society For Testing And Materials (ASTM) respectivamente, las cuales brindan técnicas adecuadas para la caracterización de productos derivados del petróleo.

Se tomó una muestra de aceite lubricante usado, la cual fue analizada por el laboratorio SGS Colombia para la determinación de las impurezas contenidas en el aceite. Los resultados de la caracterización inicial del aceite lubricante usado obtenidos por el laboratorio SGS Colombia (**ANEXO D**) y los obtenidos por los autores se muestran en la tabla 5.

Tabla 4. Resultados de la caracterización inicial del aceite usado de motor Diésel.

Parámetro	Norma	Unidad	Valor
Densidad	NTC 336	g/ml	0.866
Viscosidad	ASTM D2983	100 °C (cSt)	6.2
Viscosidad	ASTM D 2983	40 °C (cSt)	59,88
pH	ASTM D7946	-	6.734
Oxidación	ASTM E2412	A/0.1 mm	0.70
Nitración	ASTM E2412	A/0.1 mm	0.09
Hollín	ASTM E2412	A/0.1 mm	0.23
Sulfatación	ASTM E2412	A/0.1 mm	0.09
Glicol	ASTM E2412	% vol	-
Agua	ASTM E2412	% vol	0.0
Fuel	ASTM E2412	% vol	4.63
Calcio (Ca)	ASTM D6595	ppm	1154
Magnesio (Mg)	ASTM D6595	ppm	552
Molibdeno (Mo)	ASTM D6595	ppm	29
Fosforo (P)	ASTM D6595	ppm	785
Zinc (Zn)	ASTM D6595	ppm	821
Boro (B)	ASTM D6595	ppm	4
Silicio (Si)	ASTM D6595	ppm	52
Sodio (Na)	ASTM D6595	ppm	95
Aluminio (Al)	ASTM D6595	ppm	19
Cromo (Cr)	ASTM D6595	ppm	3
Cobre (Cu)	ASTM D6595	ppm	18
Hierro (Fe)	ASTM D6595	ppm	62
Plomo (Pb)	ASTM D6595	ppm	2
Manganeso (Mn)	ASTM D6595	ppm	1
Níquel (Ni)	ASTM D6595	ppm	1
Plata (Ag)	ASTM D6595	Ppm	0

Tabla 4. (Continuación)

Parámetro	Norma	Unidad	Valor
Estaño (Sn)	ASTM D6595	Ppm	0
Titanio (Ti)	ASTM D6595	Ppm	1
Vanadio (V)	ASTM D6595	Ppm	0
Bario (Ba)	ASTM D6595	Ppm	0
TAN	ASTM D664-17	mgKOH/g	2.15
TBN	ASTM D2896-15	MgKOH/g	6.0
Carbono residual	ASTM D189	% peso	1.38

Fuente: elaboración Propia

2.2.1 Densidad. El procedimiento para determinar la densidad se llevó a cabo en base a la norma NTC 336

“Grasas y aceites animales y vegetales. Método de la determinación de la densidad” la cual se fundamenta en la determinación de la densidad mediante el método de masa por volumen convencional siguiendo el protocolo propuesto por la norma, se realizaron diez replicas y los resultados se exponen en g/ml. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.

Tabla 5. Datos experimentales para la densidad del ALU.

Replicas	Densidad (g/ml)
1	0,86
2	0,87
3	0,87
4	0,87
5	0,87
6	0,87
7	0,87
8	0,86
9	0,86
10	0,86
Promedio	0,866
Desviación estándar	±0,00516

Fuente: elaboración propia

Acorde a la bibliografía la densidad de los aceites nuevos es aproximadamente 0.88 g/ml mientras que la densidad de los aceites usados se encuentra en un rango de 0.86 a 0.99 g/ml¹¹². De acuerdo con los resultados obtenidos se puede evidenciar

¹¹² FONG, Waldyr; QUIÑONEZ, Edgar y TEJADA, Candelaria. Physical-chemical characterization of spent engine oils for its recycling. Scielo. [En línea]. 2017, 15. (2). 135-144. [Consultado 20, Abril, 2019]. ISSN 1692-8261. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-82612017000200135

que el valor de densidad promedio del aceite usado es de 0.866 g/ml lo cual indica que se encuentra dentro del rango establecido para aceites lubricantes usados y la variación con el aceite nuevo no es tan significativa.

Según algunos autores como Fong, que analiza 8 referencias diferentes de aceites, la variación se debe a contaminantes presentes en el aceite tales como agua, tierra, polvo, partículas de desgaste, entre otros¹¹³.

2.2.2 Viscosidad. La viscosidad es una medida importante debido a que una viscosidad baja provocará que haya un desgaste por falta de colchón hidrodinámico, es decir que el aceite escurrirá y no creará una película entre las piezas, y el caso contrario si la viscosidad es muy alta entonces estos tienen demasiado consumo de energía¹¹⁴. La medición se realizó con base en la norma ASTM D2983 “Método estándar” por medio de un viscosímetro rotacional el cual arroja los resultados en centistokes (cSt), la muestra es medida a 100 °C¹¹⁵.

De acuerdo con la bibliografía la viscosidad de los aceites usados a una temperatura de 40 °C es de 20-25 cSt¹¹⁶ y a una temperatura de 100 °C se encuentra es aproximadamente 10 cSt y para los aceites lubricantes nuevos el valor aproximado a 100° C es de 14,5 cSt, los resultados obtenidos de la caracterización fueron 6,2 cSt a 100 ° C, lo cual quiere decir que se encuentran en un valor de viscosidad aceptable respecto a los aceites usados, sin embargo, respecto a los aceites nuevos existe una alta variación debido a los contaminantes, combinaciones de diversos aceites, aditivos, altos índices de humedad, entre otros¹¹⁷.

2.2.3 pH. Se determinó mediante la norma ASTM D7946 “Método de prueba estándar para el valor pH inicial (i-pH) de los productos petrolíferos”, es importante la determinación de este para observar los cambios que se producen en el aceite durante el proceso de oxidación¹¹⁸. El valor del pH-i se puede ver influenciado por diferentes componentes como los ésteres, ácidos orgánicos e inorgánicos, compuestos fenólicos, resinas, sales de metales, lactonas, bases débiles, sales

¹¹³ *Ibíd.*, p. 137

¹¹⁴ REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. *Op. Cit.*, p. 60.

¹¹⁵ AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for low-temperature viscosity of automatic transmission fluids, hydraulic fluids, and lubricants using a rotational viscometer. ASTM D2983. Estados Unidos.: La entidad, 2017. p 3.

¹¹⁶ BUREAU VERITAS. ¿Qué efectos tiene la oxidación en el aceite lubricante?. [Sitio WEB].Francia. Mayo 11, [Consultado el Marzo2019]. Disponible en: <http://lubrication-management.com/2017/05/11/que-efectos-tiene-la-oxidacion-en-el-aceite-lubricante/>

¹¹⁷ *Ibíd.*, p. 1.

¹¹⁸ AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for initial ph (i-ph)-value of petroleum products. ASTM D7946. Estados Unidos.: La entidad, 2014. p. 1.

ácidas de ácidos polibásicos y agentes que se adicionan como los detergentes e inhibidores¹¹⁹.

El valor del pH puede evaluar la degradación del aceite y muestra la medida de los componentes ácidos que son disociados con el potencial de corrosividad hacia los metales. Los resultados obtenidos de pH para la muestra de aceite lubricante usado analizada se encuentran en la tabla 6.

Tabla 6. Datos experimentales para el pH-i del aceite usado de motor Diésel.

Réplica	pH
1	6,70
2	6,75
3	6,71
4	6,49
5	6,72
6	6,88
7	6,79
8	6,78
9	6,78
10	6,74
Promedio	6,734
Desviación Estándar	0,10024

Fuente: elaboración propia.

Según la tabla 6, el valor promedio de pH obtenido fue de 6,734, el cual se encuentra en un rango aceptable puesto que según la bibliografía y con base en la norma ASTM D7946 el pH de los aceites lubricantes de motor nuevos está en un rango de 4 a 7¹²⁰. Los cambios relativos en el pH pueden deberse a la oxidación o a la contaminación por gases de combustión, también por ello puede haber presencia de pequeñas cantidades de ácidos fuertes que son corrosivos, y pueden causar daños considerables en el motor, o en sistemas de lubricación con un alto potencial a la formación de ácidos¹²¹.

¹¹⁹ AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Op. Cit., p.1.

¹²⁰ BUREAU VERITAS. Op. Cit., p.1.

¹²¹ BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. Detección temprana de fallas en motores de combustión interna a diésel mediante la técnica de análisis de aceite. Unemi. [En línea]. año,8, (15). 84-95. [Consultado 15, septiembre, 2018]. ISSN. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5269483>

Los motores a lo largo de su operación generan partículas de desgaste, debido a que se realiza un proceso de remoción de materiales sobre superficies en contacto metal con metal; estas partículas se encuentran en el aceite lubricante y son un indicador de desgaste del motor y degradación del aceite¹²². Por ello es preciso evaluar los elementos de desgaste presentes en el aceite lubricante de motor usado, lo cual se llevó a cabo por medio de una muestra enviada al laboratorio SGS Colombia el cual emitió los resultados incluidos en el **ANEXO D**.

Buchelli, Luis y GARCÍA, Vicente presentan el cuadro 7 que permite evaluar el estado inicial del aceite lubricante comparando los resultados obtenidos por el laboratorio con los estándares usados como referencia.

Cuadro 7. Límites utilizados como referencia.

Indicador	Detalle	Unidad	Alerta	Critico	Inaceptable
Salud	Viscosidad	CSt	<12,4 o >16,5	<11,7 o >17,2	<10 o >20
	TBN	mgKOH/g	<10	<7	<5
	Oxidación	ABS/cm	>15	>18	>25
	Nitración	ABS/cm	>13,1	>18,4	>20
	Sulfatación	ABS/cm	>20	>25	>30
	Zinc	%m	<1200 o >1800	< 1000 o >2000	<900 o >2200
Contaminantes	Silicio	Ppm	>14,5	>16,6	>20
	Boro	Ppm	>1,27	>1,37	>30
	Sodio	Ppm	>10	-	>20
	Vanadio	Ppm	>13,44	>16	>47
	Hollín	ABS/cm	>15	>30	>200
	Agua	%Vol	-	-	>0,3
Desgaste	Hierro	Ppm	>15	>17,08	>25
	Cobre	Ppm	>5	>6,76	>15
	Plomo	Ppm	>1,32	>1,47	>5
	Cromo	Ppm	>1,27	>1,38	>5
	Aluminio	Ppm	>5	>7,6	>10
	Estaño	Ppm	>1,27	>7,38	>5
	Níquel	Ppm	>3	-	>5

Fuente. elaboración propia.

¹²² *Ibíd.*, p. 88.

2.2.4 Análisis Infrarrojo. Este análisis se llevó a cabo bajo la norma ASTM E2412 “Práctica estándar para el monitoreo de condiciones de lubricantes en servicio mediante análisis de tendencias por medio de espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)”. La práctica permite evaluar el agotamiento de aditivos, la acumulación de contaminantes y la degradación; por medio de la determinación de los niveles de oxidación, nitración, hollín y sulfatación dados en A/0,1mm, al igual que los porcentajes de contaminantes como el agua, el glicol y el combustible¹²³.

Esta práctica se basa en la espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR), es un proceso espectroscópico rápido y simple que permite monitorear el estado de los lubricantes en servicio por medio de análisis de tendencias y distribución.

2.2.4.1 Oxidación. La oxidación del aceite lubricante se da en presencia de oxígeno y calor, es un proceso donde el aceite se transforma gracias a la polimerización de las moléculas orgánicas que lo constituyen; lo cual genera el deterioro de sus propiedades respecto a las originales. La oxidación del aceite puede generar grandes inconvenientes como, el aumento de la viscosidad, la obstrucción del filtro, la acumulación de depósitos y sedimentos, el desgaste corrosivo y la reducción de la vida útil¹²⁴. La muestra de aceite lubricante usado analizada por el laboratorio SGS Colombia presenta un valor de oxidación de 0,7 A/0.1 mm, el cual se considera inaceptable, ya que supera el nivel estipulado de 0.25 A/0.1mm de acuerdo con el Cuadro 7¹²⁵.

2.2.4.2 Nitración. La nitración del aceite lubricante usado es una medida de los compuestos de nitrógeno presentes en este. Durante el proceso de combustión se generan compuestos llamados óxidos de nitrógeno que al reaccionar con el combustible forman organonitratos y compuestos de nitrógeno inestables, los cuales aumentan la velocidad de formación de lodos y aligeran la degradación del aceite haciendo que pierda sus propiedades. La muestra analizada por el laboratorio SGS Colombia presenta un valor de nitración de 0.09 A/0.1 mm, el cual según el Cuadro 7 no representa una alerta en el aceite lubricante usado ya que no supera los 0.13 A/0.1 mm¹²⁶.

2.2.4.3 Hollín. Es un residuo insoluble del combustible quemado parcialmente, este se mantiene suspendido gracias a los aditivos presentes en el aceite lubricante y por ende el aceite se torna de color negro. Si el hollín se precipita puede contribuir

¹²³ AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard practice for condition monitoring of in-service lubricants by trend analysis using fourier transform infrared (ft-ir) spectrometry. ASTM E2412. Estados Unidos.: El instituto, ASTM, 2018. 1 p.

¹²⁴ BUREAU VERITAS. Op. Cit., p.1.

¹²⁵ BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. Op.Cit., p.88.

¹²⁶ BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. Op. Cit., p. 88.

a la reducción de aditivos y en algunas ocasiones aumenta la viscosidad del aceite¹²⁷, esto hace que el hollín sea un indicador de la eficiencia de la combustión. Los resultados presentados por el laboratorio SGS Colombia indican que la muestra de aceite lubricante usado tiene un valor de hollín correspondiente a 0.23 A/0.1 mm. Conforme al Cuadro 7 este valor se considera un nivel de alerta del mal funcionamiento del aceite lubricante ya que supera los 0.15 A/0.1 mm¹²⁸.

2.2.4.4 Sulfatación. La sulfatación del aceite lubricante se origina en los motores durante el proceso de combustión, en el momento en que el azufre presente en el combustible se oxida y se mezcla con agua formando ácidos de base azufre. Parte de estos ácidos se combinan con los aditivos del aceite para formar sales tales como sulfatos de magnesio, bario o calcio, la sulfatación aumenta continuamente mientras el nivel de azufre del combustible sea constante¹²⁹. La muestra de aceite analizada por el laboratorio presenta un valor de sulfatación de 0.09 A/0.1 mm, valor que acorde con el Cuadro 7 se encuentra dentro de los estándares para aceites lubricantes debido a que el valor no es mayor a 0.2 A/0.1 mm¹³⁰.

2.2.4.5 Glicol. La presencia de glicol en el aceite indica una fuga en el sistema de enfriamiento y acelera la oxidación de este. Cuando el aceite se encuentra muy oxidado es pegajoso y forma fácilmente residuos que taponan los filtros, el glicol en el aceite es inaceptable aun si la cantidad es mínima¹³¹. La muestra de aceite lubricante usado que se analizó cumple con lo dicho anteriormente, ya que presenta un porcentaje de glicol equivalente a 0%.

2.2.4.6 Agua. El agua puede contaminar el sistema entrando desde el exterior o condensándose de algún compartimiento del motor, cuando el agua se mezcla con el aceite disminuye su capacidad lubricante y se forman fácilmente depósitos. Si el agua logra calentarse lo necesario puede causar pequeñas explosiones de vapor que fracturan el metal¹³².

Dentro de los resultados arrojados por el laboratorio se encuentra que el porcentaje de agua presente en la muestra de aceite lubricante usado analizada corresponde

¹²⁷ PADILLA, Noel. Análisis de aceite para detección temprana de fallas en motores Caterpillar. [En línea]. Tesis. Universidad De San Carlos de Guatemala, Guatemala.: 2013. [Consultado 25, mayo, 2019]. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0770_M.pdf

¹²⁸ BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. Op. Cit., p.88

¹²⁹ EXXON MOBIL, LUBRICANTS E SPECIALTIES. Verdades y falacias sobre el análisis de sulfatación ¿Puede reemplazar al TBN? [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 15, marzo, 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/236996000/Consejo-128-Sulfatacion>

¹³⁰ BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. Op. Cit., p. 88.

¹³¹ PADILLA, Noel. Op. Cit., p. 32.

¹³² PADILLA, Noel. Op. Cit., p. 32.

a 0%, cumpliendo con los límites permitidos según el Cuadro 7 que indica que el porcentaje en volumen de agua no puede ser mayor a 0.3% vol.¹³³.

2.2.4.7 Combustible. La contaminación del aceite por combustible reduce su propiedad lubricante. Debido al proceso de combustión es habitual encontrar pequeñas cantidades de combustible en el aceite, pero si el nivel de combustible es superior al 4% es necesario evaluar posibles fuentes de fuga de combustible¹³⁴. La muestra de aceite analizada por el laboratorio presentó un porcentaje de combustible de 4.63%, el cual según lo mencionado anteriormente indica que proviene de algún tipo de fuga.

2.2.5 Espectrometría. Los metales de desgaste son contaminantes muy comunes en los aceites lubricantes usados cuando el tiempo de servicio es largo, por ende, es necesario evaluarlos según la norma ASTM D6595: Método de prueba estándar para la determinación de metales de desgaste y contaminantes en aceites lubricantes usados o líquidos hidráulicos usados por electrodo de disco giratorio Espectrometría de emisión atómica.

Prueba que determina la concentración de metales de desgaste presentes en el aceite usado en partes por millón (ppm); puntualmente establece la concentración de: Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Molibdeno (Mo), Fósforo (P), Zinc (Zn), Silicio (Si), Sodio (Na), Aluminio (Al), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Hierro (Fe), Plomo (Pb), Manganeso (Mn), Níquel (Ni), Plata (Ag), Estaño (Sn), Titanio (Ti), Vanadio (V) y Bario (Ba)¹³⁵.

2.2.5.1 Calcio (Ca). La presencia de calcio en el aceite puede ser atribuida a los detergentes que contiene el mismo, los cuales se encargan de mantener el aceite limpio, es decir, libre de depósitos; neutralizando los ácidos presentes. De igual forma el contenido de calcio en los aceites se debe a los aditivos adicionados a este con el objeto de que reaccionen con el lodo para mantenerlo solubles¹³⁶. El nivel de calcio presente en la muestra de aceite lubricante analizada es de 1154 ppm, siendo el valor más grande dentro de los elementos de desgaste.

2.2.5.2 Magnesio (Mg). Actualmente los principales detergentes utilizados son sales de metales alcalinotérreos como calcio, bario y magnesio¹³⁷, por ello la presencia de magnesio en el aceite al igual que la del calcio se atribuye a los aditivos

¹³³ BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. Op. Cit., p. 88.

¹³⁴ PADILLA, Noel. Op. Cit., p. 33.

¹³⁵ AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for determination of wear metals and contaminants in used lubricating oils or used hydraulic fluids by rotating disc electrode atomic emission spectrometry. ASTM D6595. Estados Unidos.: El instituto, 2017. 1-2 p.

¹³⁶ FONG, Waldyr; QUIÑONEZ, Edgar y TEJADA, Candelaria. Op. Cit., p. 141.

¹³⁷ *Ibíd.*, p.142

detergentes incorporados en el aceite. El contenido de magnesio en la muestra de aceite que se analizó equivale a 552 ppm.

2.2.5.3 Molibdeno (Mo). La presencia de molibdeno en el aceite lubricante usado se debe a fallas en los anillos de pistón y vástagos de válvulas¹³⁸, la concentración de molibdeno en la muestra de aceite estudiada es de 29 ppm.

2.2.5.4 Fósforo (P). La presencia del fósforo en el aceite lubricante se atribuye a la incorporación de aditivos de antidesgaste¹³⁹, la concentración de fósforo que contiene la muestra de aceite analizada equivale a 785 ppm.

2.2.5.5 Zinc (Zn). La concentración de zinc en el aceite lubricante al igual que la del fósforo se atribuye a la presencia de aditivos antidesgaste en el aceite¹⁴⁰, en la muestra analizada se encontró zinc en una concentración de 821 ppm.

2.2.5.6 Silicio (Si). La aparición de silicio en el aceite lubricante de motor se debe a fallas en la estanqueidad del sistema lubricante, aditivos del aceite y cristalización de empaquetaduras, de igual forma puede provenir del polvo o la tierra que ingresa por el filtro¹⁴¹. La muestra de aceite lubricante analizada por el laboratorio presenta una concentración de silicio equivalente a 52 ppm, valor considerado inaceptable debido a que superar las 20 ppm establecidas en los límites de referencia¹⁴², como se evidencia en el Cuadro 7.

2.2.5.7 Sodio (Na). La concentración de sodio en el aceite lubricante de motor se atribuye a falla en la estanqueidad del sistema lubricante lo que produce fugas del refrigerante, la entrada del refrigerante a la cámara de combustión forma residuos sólidos ricos en sodio y cromo que operan como abrasivos¹⁴³. La concentración de sodio presente en la muestra de aceite analizada según el laboratorio SGS Colombia es de 95 ppm, conforme con el Cuadro 7 este valor se considera inaceptable ya que supera la concentración límite que equivale a 20 ppm¹⁴⁴.

2.2.5.8 Aluminio (Al). La presencia de aluminio en el aceite se debe principalmente al desgaste de algunas piezas del motor, como pistones, cojinetes, bujes, cascarras, camisas, bombas de aceite, volantas de empuje, tornillos, entre otros. De igual forma proviene del aire contaminado que entra al motor¹⁴⁵. El nivel de aluminio en la muestra de aceite lubricante equivale a 19 ppm, valor que indica una concentración

¹³⁸ BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. Op. Cit., p. 88.

¹³⁹ FONG, Waldyr; QUIÑONEZ, Edgar y TEJADA, Candelaria. Op. Cit., p.142.

¹⁴⁰ *Ibíd.*, p.142.

¹⁴¹ *Ibíd.*, p.142

¹⁴² BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. Op. Cit., p. 88

¹⁴³ FONG, Waldyr; QUIÑONEZ, Edgar y TEJADA, Candelaria. Op. Cit., p.141.

¹⁴⁴ BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. Op. Cit., p. 88

¹⁴⁵ FONG, Waldyr; QUIÑONEZ, Edgar y TEJADA, Candelaria. Op. Cit., p.141.

inaceptable de acuerdo con el Cuadro 7 ya que se supera el límite de referencia de 10 ppm¹⁴⁶.

2.2.5.9 Cromo (Cr). El cromo presente en el aceite proviene del desgaste de los anillos del pistón y de los refrigerantes implementados¹⁴⁷. La cantidad de cromo identificada en la muestra de aceite analizada es de 3 ppm, concentración que indica un nivel crítico en el aceite lubricantes ya que supera el valor de 1.38 ppm¹⁴⁸; como se observa en el Cuadro 7.

2.2.5.10 Cobre (Cu). El nivel de cobre en el aceite puede atribuirse al desgaste de los cojinetes de aleación, cojinetes de empuje, guía de válvulas, casquillos de pie de biela, entre otros¹⁴⁹. Los resultados arrojados por el laboratorio indican que hay una concentración de 18 ppm de cobre, valor considerado como inaceptable en el aceite lubricante de motor ya que supera las 15 ppm permitidas¹⁵⁰, como se puede observar en el Cuadro 7.

2.2.5.11 Hierro (Fe). El contenido de hierro en el aceite lubricante se puede atribuir al desgaste de las camisas en el bloque del motor o a la corrosión causada por la oxidación de piezas del motor¹⁵¹. La muestra analizada presenta un nivel de hierro equivalente a 62 ppm, valor considerado como inaceptable de acuerdo con el Cuadro 7 ya que supera la concentración límite de 25 ppm¹⁵².

2.2.5.12 Plomo (Pb). La concentración de plomo que presenta la muestra analizada por el laboratorio corresponde a 2 ppm, nivel calificado como crítico conforme con el Cuadro 7 debido a que supera el valor de 1.47 ppm¹⁵³. El plomo contenido en el aceite lubricante usado se debe a fallas en los cojinetes o desgaste general de piezas del motor¹⁵⁴.

2.2.5.13 Manganeso (Mn). Este elemento proviene del desgaste natural del motor¹⁵⁵, en la muestra analizada se encuentra en una concentración de 1 ppm.

2.2.5.14 Níquel (Ni). La presencia de níquel en el aceite lubricante usado se atribuye a fallas de elementos del motor, como cojinetes de fricción o metales de

¹⁴⁶ BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. Op. Cit., p. 88

¹⁴⁷ FONG, Waldyr; QUIÑONEZ, Edgar y TEJADA, Candelaria. Op. Cit., p.143.

¹⁴⁸ BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. Op. Cit., p. 88

¹⁴⁹ FONG, Waldyr; QUIÑONEZ, Edgar y TEJADA, Candelaria. Op. Cit., p.142.

¹⁵⁰ BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. Op. Cit., p. 88

¹⁵¹ FONG, Waldyr; QUIÑONEZ, Edgar y TEJADA, Candelaria. Op. Cit., p.141.

¹⁵² BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. Op. Cit., p. 88

¹⁵³ *Ibíd.*, p.88.

¹⁵⁴ MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Op. Cit., p. 25.

¹⁵⁵ BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. Op. Cit., p. 88

balancines¹⁵⁶. El contenido de níquel presente en la muestra de aceite lubricante que fue analizada es mínimo, con un valor equivalente a 1 ppm que no representa una alerta ya que no supera la concentración de 3 ppm¹⁵⁷, como lo indica el Cuadro 7.

2.2.5.15 Plata (Ag). La muestra de aceite lubricante usado analizada por el laboratorio SGS Colombia no presenta concentración alguna de plata.

2.2.5.16 Estaño (Sn). La presencia de estaño en el aceite lubricante usado proviene del deterioro o fallas en los elementos del motor¹⁵⁸. Sin embargo, en este caso la muestra analizada no contiene concentración alguna de estaño como elemento de desgaste, el valor considerado como alerta para la presencia de este elemento es 1.27 ppm¹⁵⁹.

2.2.5.17 Vanadio (V). No hay presencia de vanadio en la muestra de aceite analizada por el laboratorio, lo que significa que este parámetro se encuentra en condiciones óptimas ya que los valores considerados anormales son superiores a 13.44 ppm¹⁶⁰.

2.2.5.18 Bario (Ba). La concentración de bario en la muestra de aceite analizada es nula, sin embargo, en caso de presentarse algún nivel de bario se podría atribuir a la incorporación de aditivos detergentes a base de sales¹⁶¹

2.2.6 TAN. Los productos provenientes del petróleo, ya sean nuevos o usados, pueden contener compuestos que les brindan un alto grado de acidez, bien sea como aditivos o como contaminantes formados por la degradación durante el tiempo de servicio, tales como los productos generados por la oxidación. Debido a ello se ve la necesidad de realizar esta prueba bajo la norma ASTM D664-17: Método de prueba estándar para determinación del índice de acidez de productos derivados del petróleo mediante titulación potenciométrica¹⁶².

Esta prueba se llevó a cabo para determinar el número total de acidez del aceite lubricante, ya que este valor permite evaluar la degradación y calidad en la que se encuentra nuestro aceite lubricante usado, los resultados que arroja este método vienen dados en mg KOH/g. En aceites usados, los compuestos más comunes que pueden tener características de acidez son: ácidos orgánicos e inorgánicos, ésteres,

¹⁵⁶ *Ibíd.*, p. 88.

¹⁵⁷ *Ibíd.*, p.88.

¹⁵⁸ *Ibíd.*, p.88.

¹⁵⁹ *Ibíd.*, p.88.

¹⁶⁰ *Ibíd.*, p.88.

¹⁶¹ FONG, Waldyr; QUIÑONEZ, Edgar y TEJADA, Candelaria. Op. Cit., p.142.

¹⁶² AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for acid and base number by color-indicator titration. ASTM D664-17. Estados Unidos.: El instituto,2004. 1-2 p.

compuestos fenólicos, lactonas, resinas, sales de metales pesados, sales de amoníaco y otras bases débiles, sales ácidas de ácidos polibásicos y agentes de adición como inhibidores y detergentes.

Para la determinación de ello, se realiza una titulación de la muestra por medio de una base alcohólica estándar, sabiendo que la muestra se encuentra disuelta en una mezcla de tolueno, alcohol isopropílico, agua y un indicador, el punto final se evidencia en el momento que la dilución cambia de color. El resultado arrojado por el laboratorio indica un nivel de acidez equivalente a 2.15 mg KOH/g

2.2.7 TBN. Los aceites lubricantes usados pueden contener gran cantidad de compuestos básicos presentes en su mayoría como aditivos, por ende, se realiza esta prueba de acuerdo con la Norma ASTM D2896-15: Método de prueba estándar para determinar el número base de productos derivados del petróleo mediante titulación potenciométrica con ácido perclórico. El resultado arrojado hace referencia a la cantidad de sustancia básica presente en el producto, y se puede usar como medida de degradación del lubricante durante el servicio¹⁶³.

Para la determinación se lleva a cabo una titulación con ácido alcohólico estándar, la muestra debe estar diluida en una mezcla tolueno, alcohol isopropílico, agua y un indicador, el punto final se evidencia en el momento que la dilución cambia de color.

Como se mencionó anteriormente la mayoría de compuestos alcalinos presentes en el aceite provienen de aditivos incorporados con el fin de neutralizar los derivados del azufre y los ácidos orgánicos generados por la oxidación, y así evitar daños corrosivos. En general a mayor TBN, mayor es la reserva de capacidad alcalina del aceite¹⁶⁴. La muestra de aceite lubricante usado analizada por el laboratorio SGS Colombia presenta un nivel de TBN equivalente a 6 mg KOH/ g, valor considerado como crítico conforme con el Cuadro 7 debido a que es menor al límite de referencia de 7 mg KOH/ g¹⁶⁵.

2.2.8 Carbón Residual. El valor de carbono residual de un aceite lubricante de motor puede indicar la cantidad de depósitos carbonosos que forma un aceite en la cámara de combustión del motor, al igual que la presencia de ciertos aditivos. El procedimiento para determinar el residuo de carbón se llevo a cabo bajo la Norma D189: Método de prueba estándar de Conradson para la determinación de residuos de carbono en productos derivados del petróleo. El resultado que arroja el método corresponde al porcentaje de carbono residual presente en la muestra luego del proceso de evaporación y pirolisis¹⁶⁶.

¹⁶³ *Ibíd.*, p. 1-2

¹⁶⁴ PADILLA, Noel. *Op. Cit.*, p. 33.

¹⁶⁵ BUCHELLI, Luis y GARCÍA, Vicente. *Op. Cit.*, p. 88

¹⁶⁶ AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Test Method for Conradson Carbon Residue of Petroleum Products. ASTM D189. Estados Unidos.: El instituto, 2014. 1 p.

La presencia de carbón residual en la muestra de aceite lubricante usado analizada por el laboratorio provienen de la combustión incompleta del combustible y se deposita principalmente en el cárter del motor, el valor arrojado por la prueba es de 1.38 ppm.

La determinación de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales presentes en el aceite lubricante de motor usado, los cuales son considerados el objeto principal de esta investigación, se hace por medio del Laboratorio Texas Oil Tech el cual utiliza una técnica especializada (cromatografía de gases) para la cuantificación de dichos contaminantes, los resultados obtenidos se presentan en el **ANEXO E**.

2.2.9 Bifenilos Policlorados. La determinación de los Bifenilos Policlorados se realizó mediante la norma ASTM D4059 “Método de prueba estándar para el análisis de Bifenilos Policlorados en líquidos aislantes mediante cromatografía de gases” y se reportan en ppm¹⁶⁷. Este método de ensayo describe una determinación cuantitativa de la concentración de Bifenilos Policlorados (PCB) en líquidos aislantes eléctricos mediante cromatografía de gases. También se aplica a la determinación de PCB presentes en mezclas conocidas como askarels, utilizadas como líquidos aislantes eléctricos y en aceites minerales aislados.

La norma NTC 5995 “PETRÓLEO Y SUS DERIVADOS. BASES LUBRICANTES RE-REFINADAS”, establece los requisitos que deben cumplir y los ensayos a los cuales deben ser sometidas las bases lubricantes re-refinadas para su comercialización en Colombia obtenidas mediante aceites lubricantes usados¹⁶⁸. Con base en la norma descrita anteriormente y según la caracterización fisicoquímica inicial del aceite, se determinó que el aceite lubricante de motor usado no cumple con los parámetros establecidos por dicha norma ya que el nivel de Bifenilos Policlorados se encuentra por encima del valor máximo permitido de 5 ppm, con un valor equivalente a 32,3 ppm.

2.2.10 Halógenos Totales. Se determinó según la norma ASTM D808-16 “Método de prueba estándar para cloro en productos petrolíferos nuevos y usados (Método del dispositivo de descomposición de alta presión)”, los resultados se reportan en % másico. Este método de ensayo abarca la determinación del cloro en aceites y grasas lubricantes, incluidos los aceites lubricantes nuevos y usados y las grasas que contienen aditivos. Su rango de aplicación es de 0.1 m% a 50 m% de cloro. El

¹⁶⁷ AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for analysis of polychlorinated biphenyls in insulating liquids by gas Chromatography. ASTM D4059. Estados Unidos.: El instituto, 2018. 1 p.

¹⁶⁸ INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Petróleo y sus derivados. bases lubricantes re-refinadas. NTC 5995. Bogotá D.C.: La entidad, 2013. p. 8.

procedimiento asume que no habrá compuestos que contengan halógenos distintos al cloro¹⁶⁹.

El valor obtenido de la caracterización inicial del aceite lubricante usado para los Halógenos Totales fue de 598,5 ppm, valor que se encuentra por encima de lo requerido según la resolución 1446 de 2005 que establece los parámetros y las condiciones permitidas a la cuales se puede realizar combustión de los aceites lubricantes usados¹⁷⁰, e indica que el nivel máximo permitido de Halógenos Totales en los aceites lubricantes es 400 ppm.

¹⁶⁹ AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Chlorine in new and used petroleum products (high pressure decomposition device method). ASTM D808-16. Estados Unidos.: El instituto, 2016. 1 p.

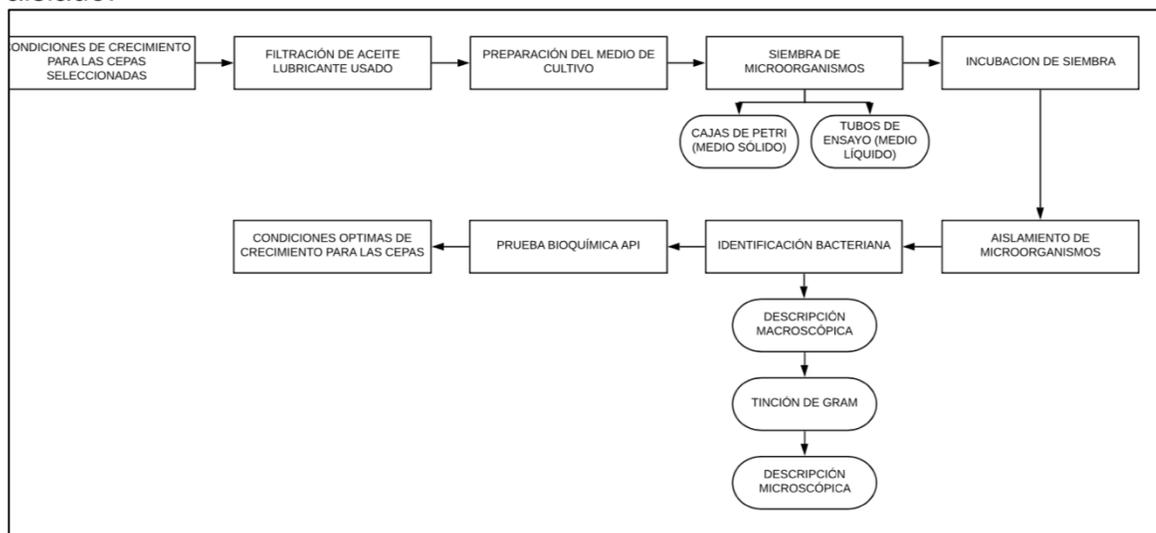
¹⁷⁰ REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Resolución 1446 (09, octubre, 2005) Por la cual se modifica parcialmente la Resolución 415 del 13 de marzo de 1998, que establece los casos en los cuales se permite la combustión de aceites de desecho o usados y las condiciones técnicas para realizar la misma. En: Congreso de la República de Colombia. Bogotá D.C. 2005. 3 p.

3. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA LAS CEPAS SELECCIONADAS

El objeto de esta investigación fue la remoción de contaminantes presentes en el aceite lubricante usado de motor Diésel, puntualmente los niveles de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales a partir de un consorcio bacteriano presente en el mismo, para ello, es indispensable determinar las condiciones de crecimiento de las cepas a utilizar en el proceso microbiológico. Por ende, en este capítulo se presentan los aspectos importantes de a tener en cuenta para la determinación de dichas condiciones.

En la ilustración 10 se evidencian las etapas necesarias para culminar dicha determinación; estas etapas son descritas en este capítulo.

Ilustración 10. Selección de condiciones óptimas de crecimiento para el consorcio aislado.



Fuente: elaboración propia.

3.1 FILTRACIÓN DEL ACEITE LUBRICANTE USADO

Se entiende como filtración a la operación unitaria encargada de separar los sólidos en suspensión presentes en un líquido, en este caso el aceite lubricante usado; este proceso es necesario ya que retira fácilmente las impurezas de gran tamaño que contiene el aceite mediante un método netamente físico. Este procedimiento se llevó a cabo por medio de una bomba de vacío que genera una presión diferencial al retirar el aire presente en el recipiente de filtrado y así succionar rápidamente el líquido a filtrar. Para esta operación se utilizó un filtro de celulosa que retiene partículas con un diámetro mayor a 1 micrómetro ubicado en un embudo Buchner que está situado en la parte superior de un beaker con desprendimiento lateral a donde es conectada la bomba de vacío.

3.2 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Para la preparación de medio de cultivo se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica para seleccionar el medio más adecuado. El medio Bushnell Haas Agar es altamente recomendado para el análisis microbiano de los combustibles o cualquier derivado del petróleo como lo son los aceites lubricantes usados; esto debido a que este medio contiene todos los nutrientes excepto la fuente de carbono necesaria para el crecimiento bacteriano, es decir, solo los microorganismos capaces de metabolizar hidrocarburos crecen en este tipo de medios¹⁷¹. Su composición se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Medio de cultivo Bushnell Haas.

Composición	Cantidad (g)
Sulfato de Magnesio	0.2
Cloruro de Calcio	0.02
Fosfato Mono-potásico	1.0
Fosfato Di-potásico	1.0
Nitrato de Amonio	1.0
Cloruro Férrico	0.05

Fuente: elaboración propia.

Como se mencionó anteriormente este medio no fue enriquecido con una fuente de carbono diferente a la del aceite lubricante usado de motor diésel. Y su preparación se evidencia en el **ANEXO F**.

Se realizaron dos tipos de medio, uno líquido y uno sólido, con la única diferencia que el medio sólido adicional a los compuestos de la Tabla 8 contiene agar; compuesto encargado de solidificar el medio. Para los dos casos estos compuestos son diluidos en 1000 ml de agua destilada y mezclados hasta homogenizar, si es necesario se debe calentar el medio para que se disuelva completamente.

Luego de ello se realizó el proceso de esterilización del medio y los implementos necesarios para la siembra como lo son cajas de Petri y tubos de ensayo, este procedimiento se llevó a cabo en un autoclave aproximadamente a 121 °C y 1 atm durante 20 minutos; la esterilización puede tardar un poco más de lo previsto debido a que el equipo tarda un poco en alcanzar la temperatura necesaria. Este procedimiento es obligatorio ya que se encarga de la eliminación de los microorganismos presentes en los elementos de laboratorio o reactivos de trabajo y evitar así algún tipo de contaminación.

¹⁷¹ HIMEDIALABORATORIES. Bushnell Haas Agar. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 20, abril, 2019]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M349.pdf>

3.3 SIEMBRA DE MICROORGANISMOS

3.3.1 Siembra en Cajas de Petri. Para la siembra en el medio sólido, se llevó a cabo una siembra en superficie, la cual consiste en verter sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido y esterilizado previamente el cual debe estar a una temperatura aproximada de 40 °C, de tal forma que cubra el fondo de la caja, se deja solidificar y se coloca sobre la superficie el inóculo por medio de una micropipeta. Con ayuda de un asa estéril se extiende el inóculo hasta su absorción total por el medio de cultivo¹⁷². La siembra se realizó en 6 cajas de Petri, 3 a una concentración de 0.1 ml de aceite y 3 a 0.4 ml de aceite; esto con el fin de evidenciar en cuál de estas condiciones se presenta un mayor crecimiento bacteriano.

3.3.2 Siembra en Tubos de Ensayo. Por otro lado, para la siembra de microorganismos en medio líquido se realizó mediante una siembra por inmersión, consistente en verter una cantidad establecida de medio, aproximadamente 10 ml y con ayuda de una micropipeta tomar diferentes concentraciones de aceite, agregar al tubo, agitar y cerrar. De igual forma que en el medio sólido, la siembra se llevó a cabo a concentraciones de 0.1 ml y 0.4 ml.

3.3.3 Incubación del consorcio. Para la incubación de microorganismos existen diversos factores para tener en cuenta que afectan en crecimiento bacteriano tales como, la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno, el nivel de agua, entre otros. Por ello, con base en la bibliografía la incubación del consorcio bacteriano presente en el aceite lubricante se llevó a cabo en una jarra de anaerobiosis, con una bolsa de generación de atmosfera libre de oxígeno, a una temperatura de 36.6 °C durante 15 días aproximadamente.

3.3.4 Evaluación cualitativa del consorcio bacteriano. La evaluación cualitativa se puede realizar mediante diferentes métodos, dentro de los cuales se destaca la descripción microscópica y macroscópica de los microorganismos, ya que son procedimientos fáciles y rápidos que permiten clasificar de forma provisional las bacterias dentro de los grupos más generales.

Partiendo de ello, la evaluación microbiana del consorcio se llevó a cabo analizando las características microscópicas y macroscópicas del cultivo sembrado tanto en las cajas de Petri como en los tubos de ensayo.

3.3.4.1 Descripción macroscópica del consorcio. La característica macroscópica de mayor importancia es la morfología, ya que esta es esencial para la

¹⁷² Santambrosio, Eduardo; ORTEGA, Marta y GARIBALDI, Pablo. Catedra Biotecnología. [En línea]. Trabajo practico. Universidad Tecnológica Nacional. Argentina.: 2009. [Consultado 15 abril, 2019]. Disponible en: https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicolll.pdf

diferenciación e identificación inicial de los microorganismos, es importante resaltar los detalles que se perciben a simple vista como, por ejemplo, tamaño, forma, consistencia, turbidez y en algunos casos el color u olor.

Para el medio de cultivo sólido las características a tener en cuenta para la identificación son:

- **Tamaño:** Este suele ser uniforme en una misma especie o tipo, existen colonias de diámetros menores a un milímetro (puntiformes), las medianas a las de hasta 4 mm y grandes a las de más de 4 mm
- **Forma:** Se determina por la forma del borde y el espesor. Los bordes pueden ser enteros o lisos, ondulados, lobulados o filamentosos y la forma puede ser circular, irregular y filamentosa
- **Consistencia y textura:** La consistencia es de dos tipos duras y secas al estar en contacto con el asa bacteriológica suelen fragmentarse, la otra es cremosa o viscosa estas al estar en contacto con el asa se pegan.
- **Superficie:** Puede ser plana, en forma de disco, convexa o semiesférica, acuminada, cerebroide, con bordes elevados o con centro elevado.
- **Comportamiento respecto a la luz:** La luz reflejada, que hace que la colonia sea brillante u opaca, translúcida que permite el paso de luz, pero no totalmente y transparente que deja pasar la luz.
- **Color:** Se describe la aparición del color y si este se difunde o no en el agar
- **Olor:** Depende de la especie de las bacterias.

Para el medio de cultivo líquido se torna un poco más complicada la descripción macroscópica, por ello para este se tienen en cuenta otras características importantes como lo son:

- **Turbidez:** Este es una de las características más importantes puesto que si hay turbidez significa que hay crecimiento de bacterias, es decir que esta característica se relaciona directamente con el crecimiento bacteriano en el medio.
- **Película:** Describe si la bacteria o colonia crece formando una película en la superficie.
- **Sedimento:** Muestra la formación de sedimentos que al agitar se suspenden en el fondo.

3.3.4.2 Descripción microscópica del consorcio. Para llevar a cabo la descripción microscópica de microorganismos es necesario realizar inicialmente una coloración que permita diferenciar e identificar las bacterias en determinados grupos, la más común es la conocida Tinción de Gram. La evaluación microscópica luego de realizar la tinción revela características importantes como la forma, la manera de agruparse, el tamaño y la estructura de los microorganismos. La morfología bacteriana microscópica describe el tamaño de las bacterias (0.5-10 micrómetros). Las bacterias se diferencian según su forma en:

- Cocos
- Bacilos
- Espirilos y espiroquetas

3.3.4.3 Tinción de Gram. Es una técnica de coloración diferencial diseñada para clasificar las bacterias en dos grandes grupos dependiendo la presencia o la ausencia de peptidoglicano, Gram positivas o Gram negativas respectivamente. El procedimiento que se llevó a cabo se presenta en el **ANEXO G**.

3.4 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

El aislamiento de microorganismos es una técnica la cual permite obtener cultivos puros de una determinada bacteria. Se basa en la separación, extracción e inoculación de una bacteria específica presente en un cultivo mixto de microorganismos.

Este procedimiento es necesario para determinar los microorganismos con los cuales se lleva a cabo el tratamiento biológico de los aceites lubricantes usados de motor, y así mismo poder establecer las condiciones óptimas de crecimiento para dichos microorganismos.

Es importante realizar el proceso de aislamiento de las cepas presentes en el aceite, debido a que las bacterias requieren ser estimuladas para que exista un alto crecimiento microbiano y su vez una mayor degradación de los contaminantes presentes en el mismo; gracias a la caracterización inicial se analiza que a pesar que las bacterias son nativas de este aceite, no están realizando un proceso de degradación adecuado al no contar con los suficientes nutrientes para su correcto desarrollo.

3.4.1 Recuperación de microorganismos. Al evaluar el desarrollo del cultivo bacteriano tanto en las cajas de Petri como en los tubos de ensayo se evidencia que existe un mayor crecimiento en los tubos, esto gracias a que los microorganismos se encuentran inmersos en el medio y por lo tanto los nutrientes son más asequibles para ellos. Debido a ello, se realizó la recuperación a partir de los tubos sembrados por medio de un proceso simple basado en tomar una pequeña cantidad de inóculo de los tubos mediante un asa bacteriológica estéril y sembrar de nuevo en placas de Petri utilizando una técnica denominada “estrías” con el fin de visualizar mejor el crecimiento y la morfología de los microorganismos, estas cajas son llevadas a incubar bajo las mismas condiciones de la sección 3.3.3.

Este procedimiento se llevó a cabo con los tubos sembrados inicialmente que presentaron un mayor crecimiento bacteriano, los cuales pueden ser estimados gracias a la turbidez generada en cada uno. Puntualmente esta práctica se realizó para 4 tubos sembrados a 0,4 ml de aceite ya que estos mostraron.

3.4.2 Aumento de la carga bacteriana. Trascurrido el tiempo de incubación de los microorganismos recuperados se evidencia un crecimiento bacteriano del cultivo mixto. Sin embargo, este no presenta una gran cantidad de biomasa lo cual no permite observar claramente la morfología de las cepas presentes en dicho consorcio. Por tal razón, se hace necesario aumentar la carga bacteriana mediante el enriquecimiento del medio de cultivo, el cual se lleva a cabo adicionando determinado porcentaje de azúcar al medio.

En este caso se usó glucosa 1-hidrato ya que es el monosacárido más usados para este tipo de procedimientos, adicional a ello es fácil de conseguir y presenta buenos resultados. Con base en la literatura este azúcar se debe adicionar a medios de cultivo a razón de 1 a 40 g/l¹⁷³.

3.4.2.1 Medio de cultivo solido enriquecido. El medio de cultivo solido enriquecido consta de 37g/l “agar nutritivo” y adicional a ello 20g de glucosa 1-hidrato, se opta por agar nutritivo debido a que como su nombre lo indica este contiene nutrientes puntuales que estimulan el crecimiento bacteriano. El medio luego de ser preparado se llevó al proceso de esterilización ya mencionado en el documento y posteriormente bajo las condiciones indicadas es servido en cajas de Petri.

Tabla 8. Composición Agar Nutritivo.

Composición	Cantidad (g/l)
Peptona	10
Extracto de carne	10
Cloruro de Sodio	5
Agar	12

Fuente: elaboración propia.

Una vez culminado el procedimiento anterior se realizaron pases sucesivos de las cajas servidas con Bushnell Haas para la recuperación a las cajas servidas con el medio enriquecido con el fin de que los microorganismos aumenten su biomasa, es decir, incrementen las unidades formadoras de colonias (UFC) en un tiempo más corto, y se llevan a incubar de 3 a 5 días bajo las mismas condiciones de temperatura, pero esta vez en condiciones de aerobiosis para evaluar el comportamiento de las bacterias.

¹⁷³ MICROKIT. Medios de Cultivo. [Sitio WEB]. Madrid, España. La entidad. [Consultado abril, 2019]. Disponible en: <http://www.medioscultivo.com/dextrosa-glucosa-anhidra-para-microbiologia/>

3.4.2.2 Medio de cultivo líquido enriquecido. El procedimiento para el medio de cultivo líquido es bastante similar, este contiene 8g/l de “Caldo nutritivo” y 20g/l de glucosa anhidra, una vez preparado el medio enriquecido es esterilizado y servido en Erlenmeyer con tapa rosca.

Tabla 9. Composición caldo nutritivo.

Composición	Cantidad (g/l)
Peptona	5
Extracto de carne	3

Fuente: elaboración propia.

Posteriormente, estos Erlenmeyer fueron inoculados y llevados a incubar bajo las mismas condiciones descritas en el párrafo anterior para el medio sólido enriquecido.

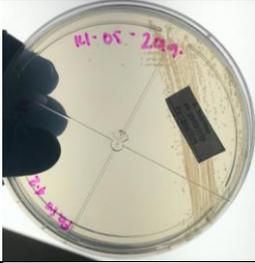
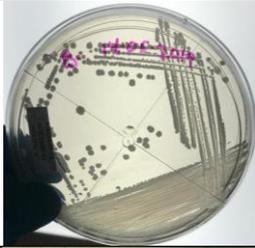
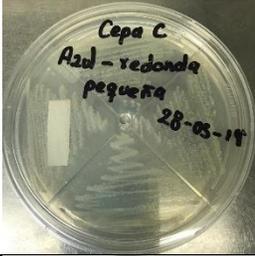
3.4.3 Medio de Cultivo óptimo. Una vez concluido el tiempo de incubación de las siembras realizadas en el medio enriquecido se obtuvo un gran aumento de carga bacteriana como era de esperarse, aunque el aumento de biomasa es un aspecto positivo y permite visualizar con un poco más de claridad la morfología de las colonias surge un inconveniente debido a que los microorganismos al estar estimulados con una alta fuente de carbono como lo es la glucosa y adicional a ello los nutrientes contenidos en el agar crecen de forma excesiva lo cual no permite una identificación macroscópica certera de las cepas.

Sin embargo, en las siembras realizadas en medio enriquecido se logró visualizar 4 colonias con morfologías diferentes las cuales deben ser purificadas, y para ello es necesario plantear un nuevo medio de cultivo intermedio que permita tener carga bacteriana suficiente para identificar a simple vista la morfología, pero no demasiada que impida dicho procedimiento. Por tal razón, se opta por utilizar un medio de cultivo entre el inicial y el enriquecido para lograr este propósito; el medio de cultivo óptimo propuesto para el crecimiento de los microorganismos presentes en el consorcio es únicamente Agar Nutritivo, ya que este brinda los nutrientes suficientes para el crecimiento bacteriano y al retirar la glucosa se evita el crecimiento desmedido del microorganismo.

3.4.4 Purificación de las cepas. Una vez definido el medio de cultivo óptimo para el crecimiento bacteriano del cultivo mixto, fue necesario realizar pases sucesivos en cajas de Petri de cada una de las bacterias identificadas morfológicamente, es decir, por medio de un asa bacteriológica tomar únicamente la colonia con morfología definida y sembrarla nuevamente en una caja de Petri servida con el medio de cultivo óptimo (Agar Nutritivo), este procedimiento se llevó a cabo con las 4 cepas que presentan una morfología clara y definida dentro del cultivo. De existir

algún tipo de impureza se hace necesario repetir la técnica hasta eliminar dicha contaminación y obtener así la cepa pura.

Cuadro 8. Cepas purificadas.

Cepa	Imagen
Cepa A	
Cepa B	
Cepa C	
Cepa D	

Fuente: elaboración propia.

3.4.5 Incubación de cepas aisladas. La incubación de las colonias aisladas y purificadas tiene el mismo principio que la incubación del consorcio con pequeñas diferencias. Se realizó a una temperatura de 36.6 °C, en condiciones de aerobiosis ya que en la fase de aislamiento se comprobó que el crecimiento de los microorganismos se veía favorecido bajo estas condiciones.

3.4.6 Evaluación cualitativa de las cepas aisladas. La identificación bacteriana de las colonias que fueron aisladas tiene el mismo principio que la evaluación del consorcio, sección 3.3.4. Con la única diferencia que aparte de la descripción

macroscópica y microscópica que brindan una clasificación general de los microorganismos, fue necesario realizar una prueba bioquímica que arrojó resultados más específicos acerca de la clase de bacteria con la cual se está trabajando.

3.4.6.1 Pruebas bioquímicas api. Las pruebas bioquímicas api permiten realizar la identificación rápida de bacterias de tipo Gram negativas, Gram positivas y levaduras, con base en un sistema estandarizado que identifica el microorganismo mediante un software que contiene información sobre millones de bacterias existentes.

Existe una gran variedad de pruebas bioquímicas establecidas para clasificar las bacterias según su género y su especie, por lo tanto, se deben tener en cuenta ciertos factores a la hora de elegir la prueba indicada. Para este caso la selección se basa en los resultados obtenidos por la descripción macroscópica y microscópica, es decir, la morfología de la cepa y la tinción de Gram. Según esto, las pruebas aptas para las cepas son:

- api STAPH: Este tipo de prueba permite la identificación de bacterias que pertenecen al género *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kokuria*, consta de 20 test bioquímicos estandarizados y miniaturizados, y una base de datos específica. Esta prueba se realizó a la cepa D debido a que dicha cepa registro cocos Gram positivos en la coloración y una morfología circular regular, con base en ello, se prevé que la cepa pertenece al género *Micrococcus* y por ende se realiza esta prueba.
- api 20 STREP: Esta asocia pruebas bioquímicas que muestran gran poder discriminatorio, lo cual permite realizar un diagnóstico perteneciente a los géneros *Streptococos*, *Enterococos*. y para los gérmenes relacionados más comunes. Esta prueba se utilizó también en la identificación de la cepa D con el fin de obtener un resultado más específico ya que la prueba anterior no abarca todas las posibilidades.
- El api 50 CH: Es un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los carbohidratos en los microorganismos. El API 50 CH se utiliza en combinación con el API 50 CHL Medium para la identificación de *Lactobacillus* y microorganismos próximos. Esta prueba se realizó para las cepas A, B Y C debido a que estas presentaron bacilos cortos Gram positivos en la coloración.

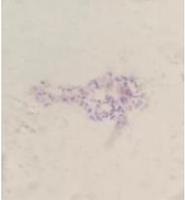
El procedimiento el cual se llevó a cabo para la identificación de las cepas presentes en el consorcio aislado se muestra en el **ANEXO H** y las imágenes que evidencian la experimentación se presentan en el **ANEXO T**.

3.5 ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el capítulo que lleva por título DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA LAS CEPAS SELECCIONADAS.

3.5.1 Evaluación cualitativa del consorcio bacteriano. A continuación, se muestra la descripción macroscópica y microscópica del consorcio bacteriano.

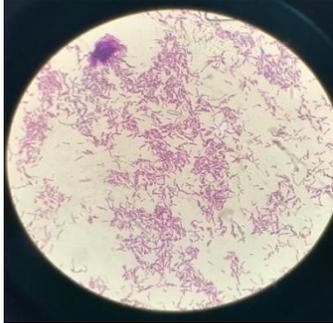
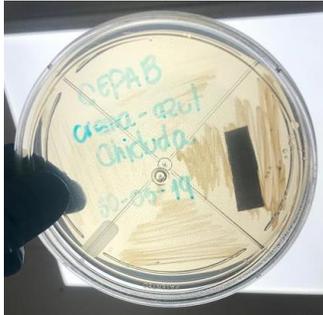
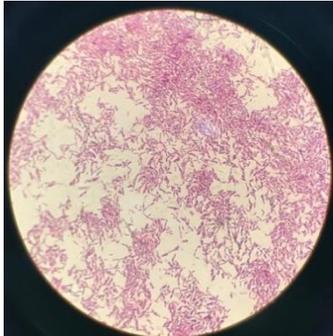
Cuadro 9. Identificación del Consorcio Bacteriano.

Cultivo	Imagen	Descripción Macroscópica	Descripción Microscópica
Consorcio		Se evidencian diversas colonias con diferente morfología cada una.	 Bacilos cortos Gram Positivos y Gram Negativos

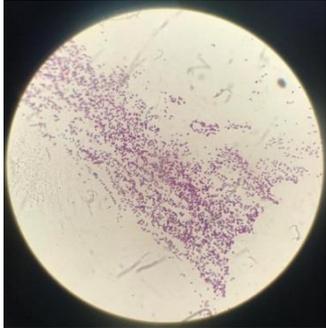
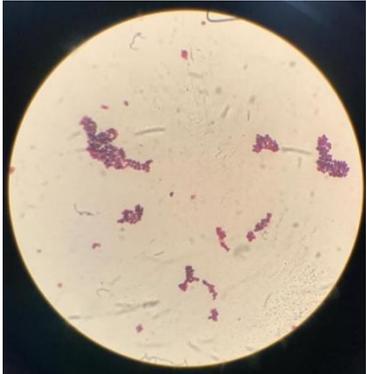
Fuente: elaboración propia.

3.5.2 Evaluación cualitativa de las cepas aisladas. A continuación, se presenta la descripción macroscópica y microscópica de las cuatro cepas aisladas del cultivo mixto presente en el aceite lubricante de motor usado. La caracterización macroscópica incluye aspectos importantes como: tamaño, forma, borde, consistencia, superficie y color de las bacterias obtenidas; por otro lado, siguiente la técnica de coloración de Gram y la observación bajo el lente objetivo de aumento de 100 x se obtiene la caracterización microscópica.

Cuadro 10. Identificación macroscópica y microscópica de las cepas aisladas.

Cepa	Imagen	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
Cepa A		<p>Tamaño: Mediano (1mm - 4mm de diámetro)</p> <p>Forma: Irregular</p> <p>Bordes: Ondulados</p> <p>Consistencia y textura: Cremosa</p> <p>Superficie: Semiesférica</p> <p>Color: Blanco</p>	 <p>Bacilos Gram Positivos</p>
Cepa B		<p>Tamaño: Mediano (1mm - 4mm de diámetro)</p> <p>Forma: Irregular</p> <p>Bordes: Ondulados</p> <p>Consistencia y textura: Seca</p> <p>Superficie: Plana</p> <p>Color: Blanco</p>	 <p>Bacilos Gram positivos</p>

Cuadro 10. (Continuación)

Cepa	Imagen	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
Cepa C		<p>Tamaño: Puntiformes (0mm - 1mm de diámetro)</p> <p>Forma: Circular</p> <p>Bordes: Lisos</p> <p>Consistencia y textura: Cremosa</p> <p>Superficie: Semiesférica</p> <p>Color: Azul</p>	 <p>Bacilos cortos Gram positivos</p>
Cepa D		<p>Tamaño: Mediano (1mm - 4mm de diámetro)</p> <p>Forma: Circular</p> <p>Bordes: Lisos</p> <p>Consistencia y textura: Cremosa</p> <p>Superficie: Semiesférica</p> <p>Color: Amarillo</p>	 <p>Cocos Gram positivos</p>

Fuente: elaboración propia.

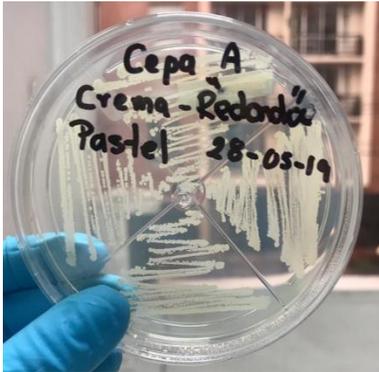
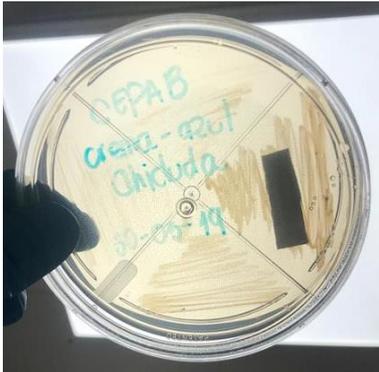
3.5.2.1 Identificación bioquímica api.

Gracias al correcto crecimiento bacteriano por parte de todas las cepas aisladas, la cuales se encuentran puras. Fue posible concluir que la caracterización

macroscópica y microscópica presentada en el cuadro 9, brinda una clasificación general y parcial de cada una de las cepas.

Sin embargo, esto no es suficiente para realizar una identificación confiable, por lo que fue necesario llevar a cabo una identificación a partir de pruebas bioquímicas api. Los resultados arrojados por dichas pruebas se presentan en el cuadro 11.

Cuadro 11. Identificación de las cepas aisladas por pruebas bioquímicas api.

Cepa	Imagen	Identificación	Observaciones
Cepa A		<p><i>Bacillus licheniformis</i>: 99%</p> <p><i>Bacillus lentus</i>: 0.9%</p>	Ve anexo J.
Cepa B		<p><i>Bacillus lentus</i>: 99%</p> <p><i>Bacillus megaterium</i>: 0.8%</p>	Ver anexo K.

Cuadro 11. (Continuación)

Cepa	Imagen	Identificación	Observaciones
Cepa C		<p><i>Bacillus circulans</i>: 98.5%</p> <p><i>Peanibacillus lautus</i>: 0.7%</p>	Ver anexo L.
Cepa D		<p><i>Streptococcus Uberis</i>: 99%</p>	Ver anexo M.

Fuente: elaboración propia.

3.5.3 Determinación de condiciones óptimas del consorcio aislado. Luego de la identificación y clasificación de los microorganismos, fue necesario consultar bibliografía que permitió establecer las condiciones óptimas para el crecimiento microbiano de las cepas identificadas, para ello se tuvieron en cuenta diversos aspectos como temperatura, presencia de oxígeno y pH, los cuales están relacionados directamente con el crecimiento bacteriano.

Para este caso se evaluó principalmente la temperatura y la presencia de oxígeno, ya que las bacterias al ser aisladas del aceite lubricante usado están habituadas a dicho pH, es decir, el pH se mantiene en un rango neutro constante. A continuación, se presentan las características principales de cada cepa, partiendo de la revisión bibliográfica:

3.5.3.1 Cepa A (*Bacillus licheniformis*). Bacteria del género *Bacillus*, especie *Bacillus licheniformis*, de tipo Gram positiva. Es un bacilo de tipo anaerobio

facultativo, lo cual puede verse favorecido por presencia o por ausencia de oxígeno, morfológicamente tienen forma de bacilos en forma de bastón, su temperatura óptima es de 50 °C y puede llegar a soportar temperaturas mayores a estas, sin embargo, a 37 °C es la temperatura óptima para la secreción de sus enzimas, estas bacterias crecen de 2 a 5 días¹⁷⁴.

3.5.3.2 Cepa B (*Bacillus lentus*). Bacteria del género *Bacillus*, especie *Bacillus lentus*, de tipo Gram positiva. Bacilos en forma de varillas rectas o ligeramente curva colonias aerobias estrictas que son blanquecinas, opacas y planas con superficie brillante y redonda. Temperatura de crecimiento de 10 a 35 °C, aunque pueden crecer a una temperatura más elevada, estas bacterias crecen de 2 a 3 días¹⁷⁵.

3.5.3.3 Cepa C (*Bacillus circulans*). Bacteria del género *Bacillus*, especie *Bacillus circulans*, de tipo Gram positivo. Este tipo de bacterias rectas u ocasionalmente barras curvadas, son anaerobias facultativas, la temperatura óptima de crecimiento es de 37° C, las colonias tienen márgenes irregulares, también pueden marcar Gram negativa debido a sus esporas, crecen en 2 días¹⁷⁶.

3.5.3.4 Cepa D (*Streptococcus uberis*). Bacteria del género *Streptococcus* perteneciente al grupo piogénico¹⁷⁷ de tipo Gram Positiva, esférica y anaerobia facultativa. Estas bacterias crecen en cadenas o pares, donde cada división celular ocurre a lo largo de un eje. Tienen un rango de temperatura de crecimiento de 25 a 45 °C, con una temperatura óptima equivalente a 37 °C¹⁷⁸.

Las cuatro cepas pueden ser consideradas como mesófilos según la literatura, en general las cuatro coinciden en su temperatura óptima de crecimiento, la cual se encuentra entre 35 y 37 °C, por ello se optó por escoger una temperatura intermedia para su crecimiento que corresponde a 36 °C.

¹⁷⁴MICROBEWIKI. *Bacillus licheniformis*. [Sitio WEB]. La entidad. [19, abril, 2019]. Disponible en: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_licheniformis

¹⁷⁵ ABYS ENCYCLOPEDIA. *Bacillus lentus*. [Sitio WEB]. La entidad. [20, mayo, 2019]. Disponible en: <http://www.tgw1916.net/Bacillus/lentus.html>

¹⁷⁶ ABYS ENCYCLOPEDIA. *Bacillus Circulans*. [Sitio WEB]. La entidad. [20, mayo, 2019]. Disponible en: <http://www.tgw1916.net/Bacillus/circulans.html>

¹⁷⁷ PROGRAMA DE CONTROL EXTERNO DE CALIDAD SEIMC. Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. [En línea]. España, Milagrosa: Julio 2019. [Consultado 21, mayo, 2019]. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/ccs-2006-bacteriologia1.pdf>

¹⁷⁸ INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA. Diagnóstico microbiológico de género *Streptococcus*. [En línea]. Chile: Julio 2019. [Consultado 21, mayo, 2019]. Disponible en: http://www.sochinf.cl/sitio/templates/sochinf2008/documentos/presentaciones_microbiologia_a_cli_2011/9_sr_Alarcon.pdf

El oxígeno es otro factor determinante para el crecimiento del consorcio, algunas de las cepas son anaerobias facultativas y las otras aerobias facultativas, es decir, la presencia o ausencia de oxígeno, no les impedirá el crecimiento, sin embargo, se realizaron diversas siembras a lo largo de la experimentación a dos diferentes condiciones, la primera en ausencia de oxígeno donde los microorganismos mostraron crecimiento en el día 5 en una cantidad aceptable de biomasa, y la otra con presencia de oxígeno, la cual mostró mejores resultados ya que los microorganismos crecieron en 3 días y con una mayor biomasa. Por tal razón, se determinó como condición óptima de crecimiento la aerobiosis.

Por último, es importante conocer el pH adecuado para dichas cepas evitando así la inhibición o muerte de los microorganismos, dichas bacterias crecen a un pH óptimo entre 6 y 8 por lo cual son considerados microorganismos neutrófilos; esto favorece la experimentación ya que el aceite lubricante usado tiene un pH de 6.7, por lo tanto no es necesario realizar ningún tipo de adecuación ya que las bacterias se desarrollaron adecuadamente a este valor de pH, como era de esperarse debido a que las cepas son aisladas de dicho aceite.

Cuadro 12. Condiciones óptimas de crecimiento

Microorganismo	Condición	Descripción	Valor Optimo
Cepa A	Temperatura	Mesófilo	37 °C
	Oxígeno	Anaerobio Facultativo	Presencia o ausencia de oxígeno
	pH	Neutrófilo	6 – 7.5
Cepa B	Temperatura	Mesófilo	35 °C
	Oxígeno	Aerobio Estricto	Presencia de oxígeno
	pH	Neutrófilo	8
Cepa C	Temperatura	Mesófilo	37 °C
	Oxígeno	Anaerobio Facultativo	Presencia o ausencia de oxígeno
	pH	Neutrófilo	7
Cepa D	Temperatura	Mesófilo	37 °C
	Oxígeno	Anaerobio Facultativo	Presencia o ausencia de oxígeno
	pH	Neutrófilo	7

Cuadro 12. (Continuación)

Microorganismo	Condición	Descripción	Valor Optimo
Consorcio	Temperatura	Mesófilo	36 °C
	Oxígeno	Aerobio	Presencia de oxígeno
	pH	Neutrófilo	6 – 8

Fuente: elaboración propia.

Con base en lo descrito anteriormente y en lo planteado por el cuadro 12, las condiciones óptimas para el desarrollo adecuado del consorcio bacteriano son una temperatura de 36 °C con una exactitud de +/- 1 °C, un pH neutro y un suministro de oxígeno. Esto con el fin de obtener una alta cantidad de biomasa para el proceso posterior (Tratamiento Biológico).

4. TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE LOS ACEITES LUBRICANTES USADOS DE MOTOR DIÉSEL PARA LA REMOCIÓN DE HALOGENUROS TOTALES Y BIFENILOS POLICLORADOS

Con el fin de plantear una alternativa diferente a las convencionales para la reutilización de los aceites lubricantes usados de motor Diesel, se propuso un tratamiento biológico para la remoción de Halogenuros Totales y Bifenilos Policlorados presentes en el aceite, mediante la utilización de un consorcio bacteriano nativo como se ha descrito a lo largo de la investigación.

En esta sección se muestra el tratamiento microbiológico para los aceites lubricantes usados de motor Diésel propuesto por los investigadores y el desarrollo experimental planteado, su análisis y sus resultados.

4.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Con el fin de cumplir con el objetivo de la investigación se plantean diferentes alternativas enfocadas a las proporciones entre ALU y el consorcio bacteriano aislado, buscando cuál de ellas presenta una mayor remoción de Bifenilos Policlorados y Halogenuros Totales.

4.1.1 Objetivo experimental. Evaluar cuantitativamente la disminución de Halogenuros Totales y Bifenilos Policlorados en el aceite lubricante usado de motor Diésel.

Para el desarrollo experimental se plantea una serie de proporciones obtenidas de la literatura, con el fin de encontrar la mejor alternativa en la disminución de dichos contaminantes.

Las alternativas propuestas y sus respectivas proporciones (Medio/ALU) se muestran en el cuadro 13 y se describen en el parrafo siguiente.

Cuadro 13. Proporciones de reactivos del tratamiento biológico.

Proporción	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
Volumen total (ml)	450	450	450

Fuente: elaboración propia.

Se realizaron las proporciones de los experimentos partiendo de un volumen total de 450 ml y teniendo en cuenta una heurística microbiológica la cual indica que el inóculo debe estar dentro de un rango de 8-10% del medio de cultivo total; además se realizaron una réplica de cada una de las alternativas. El desarrollo experimental que se llevó a cabo se describe a continuación:

- **Alternativa 1:** Proporción 25/75¹⁷⁹ esta primera alternativa consta de 25% de medio (101.25g) con 10% de inóculo respecto al medio (11.25g) y 75% de ALU (337.5g), para un total de volumen de 450 ml
- **Alternativa 2:** Proporción 50/50¹⁸⁰ consta de 50% de medio (205.5g) con 10 de inóculo respecto al medio (22.5g) y 75% de ALU (225 g), para un total de 450 ml
- **Alternativa 3:** Proporción 75/25¹⁸¹ esta última alternativa consta de 75% de medio (303.75g) con 10% de inóculo respecto al medio (33.75) y 25% de ALU (112.5g), para un total de 450 ml

4.1.2 Tratamiento microbiológico. El tratamiento consistió en un experimento en el cual el aceite lubricante usado es puesto en contacto directo con el consorcio aislado que está conformado por las cuatro diferentes cepas identificadas, bajo las condiciones ya establecidas en el capítulo anterior.

El desarrollo experimental consta de tres montajes a diferentes proporciones de inóculo y aceite lubricante usado, los cuales fueron basados en la bibliografía, el experimento se realizó en cabina de flujo laminar, con el fin de asegurar la esterilidad del tratamiento.

Inicialmente se prepararon 3 L de medio de cultivo “Caldo Nutritivo”, el cual fue esterilizado bajo el procedimiento estipulado para evitar contaminación, luego de eso con el aceite previamente filtrado se realizaron las distribuciones correspondientes en Erlenmeyers de 500 mL, es decir, se adicionó el 25%, 50% o 75 % de aceite en cada uno según corresponda; este procedimiento se llevó a cabo

¹⁷⁹ MUNNA, Bhattacharya. DIPA, Biswas. SANTANU, Sana y SRIPARNA, Datta. Biodegradation of waste lubricants by a newly isolated Ochrobactrum sp. C1. [En línea]. India.: 2015,5. (5). 7. [Consultado 23, mayo, 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/276832565_Biodegradation_of_waste_lubricants_by_a_newly_isolated_Ochrobactrum_sp_C1

¹⁸⁰ GUTIERREZ, David y PEREZ, Johana. 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. [En línea]. Tesis. Fundación Universidad de América, Bogotá D. C.: [Consultado 01, junio, 2019]. Disponible en: <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7382/1/6131051-2019-1-IQ.pdf>

¹⁸¹ MUNNA, Bhattacharya. DIPA, Biswas. SANTANU, Sana y SRIPARNA, Datta. Op., Cit. p. 2.

en la cabina de flujo laminar. De igual forma, los Erlenmeyer que contienen el aceite a las diferentes proporciones de aceite llevados a la autoclave para eliminar cualquier microorganismo presente en este, con el fin de garantizar que las bacterias que realicen la remoción sean las presentes en el consorcio aislado.

Una vez se realizó lo descrito anteriormente, el paso a seguir es la inoculación de cada una de las cepas aisladas e identificadas en 50 mL de medio cada una, esta inoculación se hizo a una concentración de 24×10^6 N° de bacterias/mL la cual fue determinada mediante la escala de Mc Farland. Se llevó a la incubadora de agitación precisa durante 24 horas, esto se realizó para garantizar la fase de adaptación de las cepas y asegurar una cantidad considerable de biomasa al poner en contacto directo.

Posteriormente, con ayuda de pipetas estériles se toma la proporción de inóculo (4 cepas) indicada en el cuadro 12 para la alternativa y es llevada a la cantidad de medio de cultivo estipulado en el mismo cuadro para el desarrollo experimental, luego de esto se agregó lentamente el medio inoculado a el Erlenmeyer que contiene la cantidad de aceite lubricante usado correspondiente para dicha alternativa. La mezcla se llevó a la incubadora de agitación precisa durante 7 días¹⁸² a 36 °C y 100 rpm. Este procedimiento se realizó para cada alternativa y su respectiva replica.

4.1.3 Adecuación de las muestras. Una vez terminado el tiempo de tratamiento fue necesario realizar la adecuación de las muestras para que puedan ser analizadas por un laboratorio especializado. Por tanto, el aceite tratado debe cumplir con una serie de parámetros requeridos por el laboratorio para realizar adecuadamente las pruebas correspondientes de los contaminantes presentes en el mismo.

Se realizó la adecuación de las muestras principalmente con el fin de que el aceite a analizar no contenga agua ya que la presencia de esta genera una variación significativa en los resultados, dicha adecuación se describe en el **ANEXO M**.

4.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación, se muestra los resultados obtenidos durante y después del tratamiento de contacto directo entre el aceite lubricante usado y el consorcio bacteriano aislado.

4.2.1 Evaluación cualitativa del tratamiento biológico. Las muestras de cada uno de los tratamientos y las réplicas respectivas fueron observadas diariamente durante el tiempo de residencia en la incubadora de agitación precisa, con el objeto

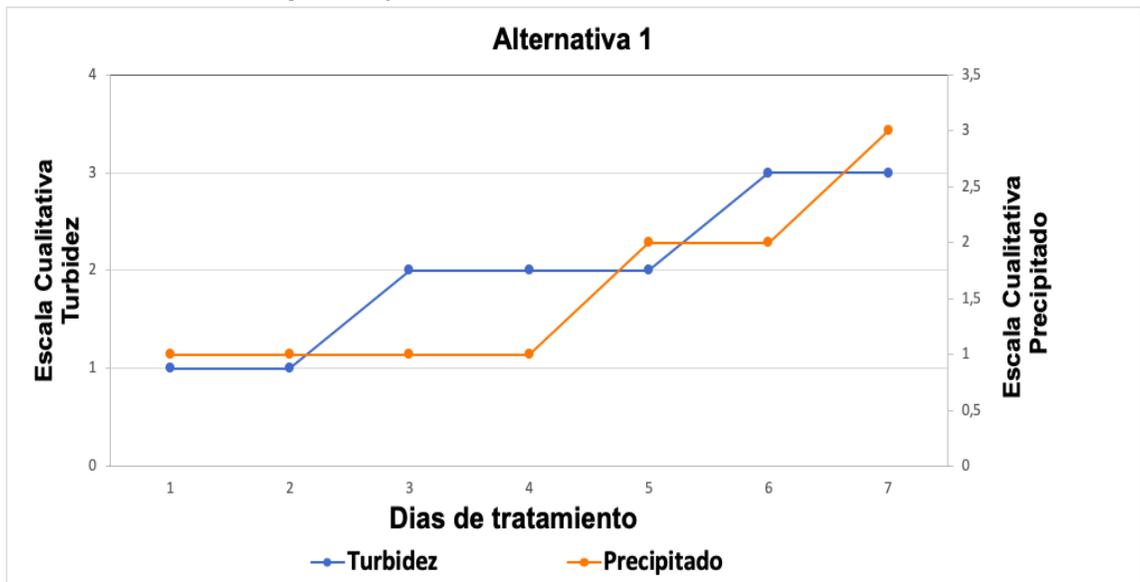
¹⁸² MUNNA, Bhattacharya. DIPA, Biswas. SANTANU, Sana y SRIPARNA, Datta. Op., Cit. p. 3.

de evidenciar los cambios generados en el aceite lubricante usado y el comportamiento de los microorganismos.

Con el fin de realizar adecuadamente dicha evaluación se tuvo en cuenta una escala cualitativa planteada con base en el método conocido como recuento en placa el cual consiste en determinar el tamaño de la población bacteriana de la muestra, ratificando el crecimiento exponencial de cultivo bacteriano; dicha escala está basada en 3 niveles que describen la variable analizada, donde 1: bajo, 2: medio y 3: alto. Con base en ello, se obtuvieron las siguientes gráficas que exponen el comportamiento de las muestras de cada alternativa, basándose en la turbidez del medio y la cantidad de precipitado.

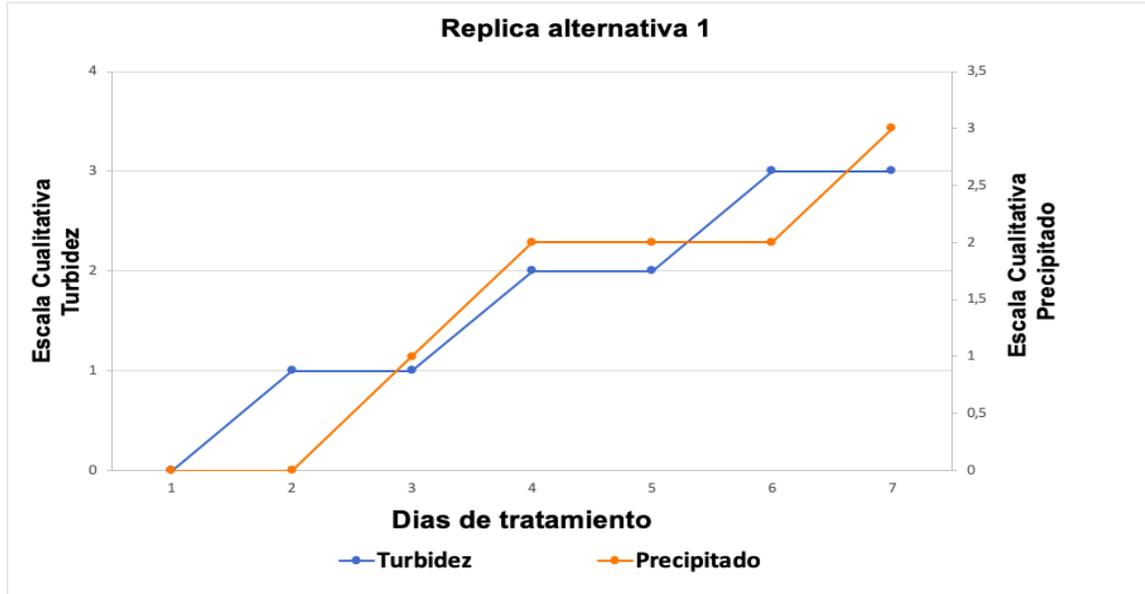
Inicialmente se muestra el comportamiento de la alternativa 1 y su respectiva réplica a lo largo del tratamiento microbiológico desarrollado.

Gráfica 1. Turbidez y Precipitado Alternativa 1.



Fuente: elaboración Propia.

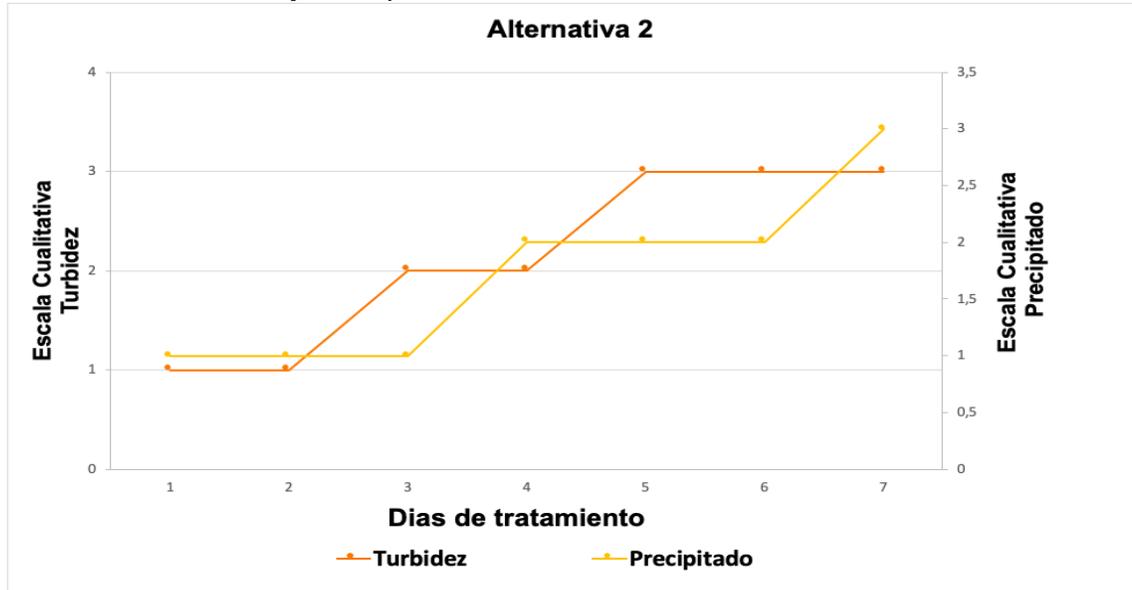
Gráfica 2. Turbidez y Precipitado réplica Alternativa 1.



Fuente: elaboración propia.

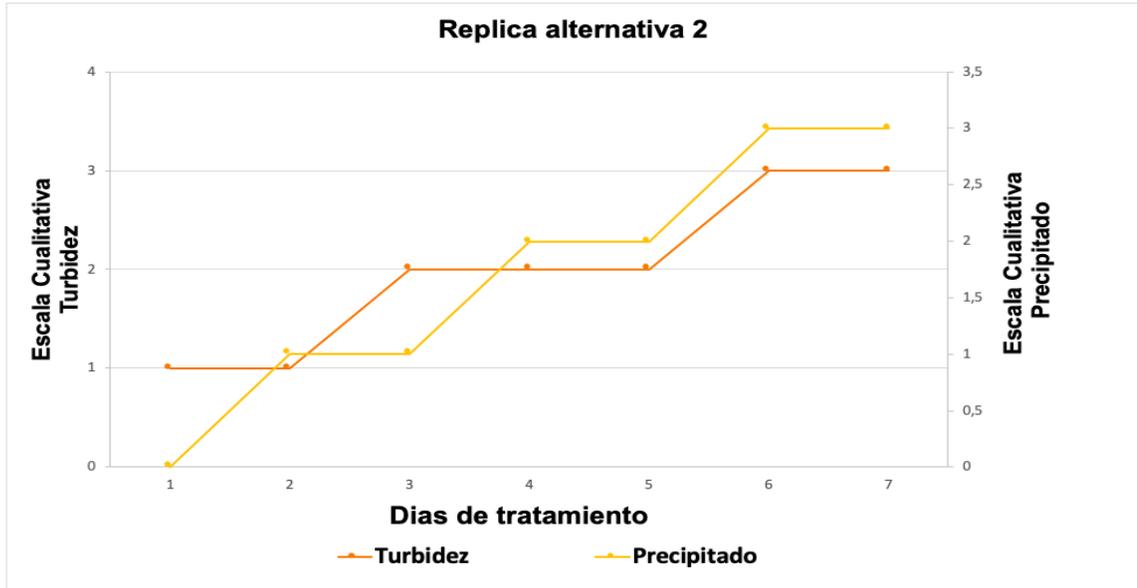
A continuación, se enseña la variación presentada por alternativa 2 y su réplica durante el tiempo de tratamiento.

Gráfica 3. Turbidez y Precipitado Alternativa 2.



Fuente: elaboración propia.

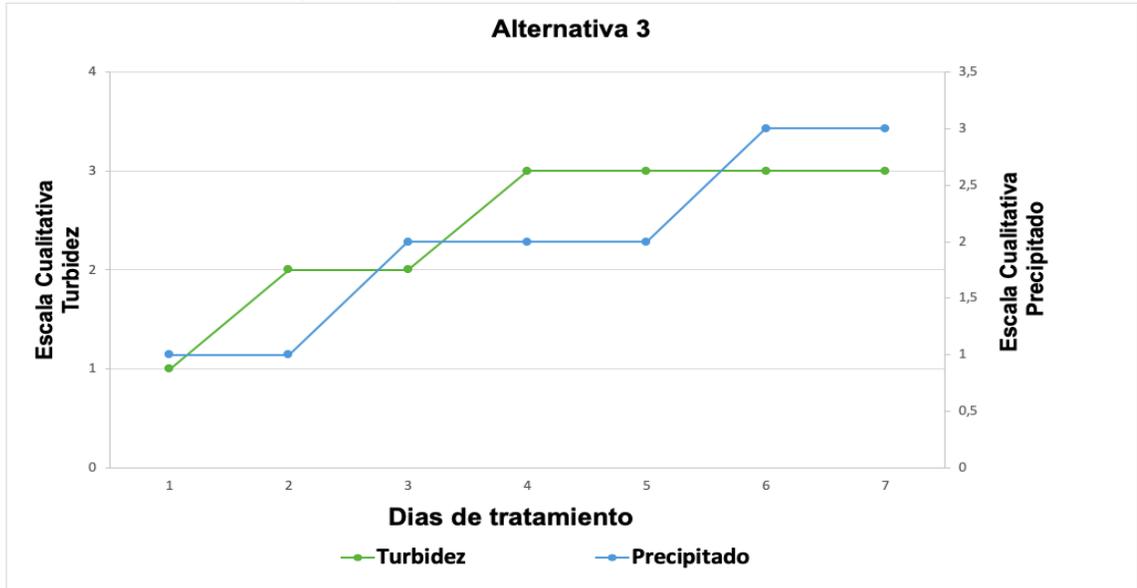
Gráfica 4. Turbidez y Precipitado réplica Alternativa 2.



Fuente: elaboración propia.

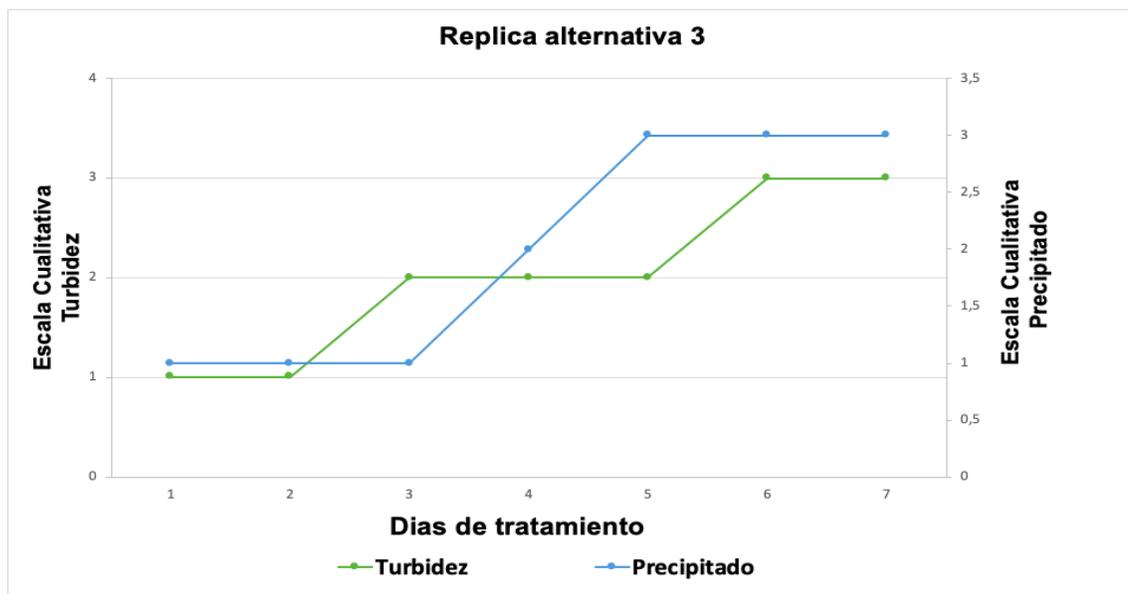
Por último, se expone el desarrollo cualitativo de la alternativa 3 y su réplica durante el tratamiento biológico.

Gráfica 5. Turbidez y Precipitado Alternativa 3.



Fuente: elaboración propia.

Gráfica 6. Turbidez y Precipitado réplica Alternativa 3.



Fuente: elaboración propia.

Como se evidencia en las gráficas presentadas anteriormente, tanto la turbidez como el precipitado van aumentando para cada una de las alternativas a medida que transcurre el tiempo, mostrando la turbidez y precipitado más notable en el día 7, esto se debe al aumento de la población bacteriana durante el tratamiento biológico. De igual forma, se puede observar que el aumento de carga microbiana fue más acelerado para la alternativa 3 debido a que cuenta con un volumen de medio y de inóculo mayor a las demás.

El color fue otra variable analizada durante la evaluación cualitativa, pero no se presenta en las gráficas debido a que el aceite mantuvo para cada alternativa su color oscuro característico durante todo el tratamiento, es decir, no sufrió ningún tipo de pérdida, lividez o palidez en esta cualidad.

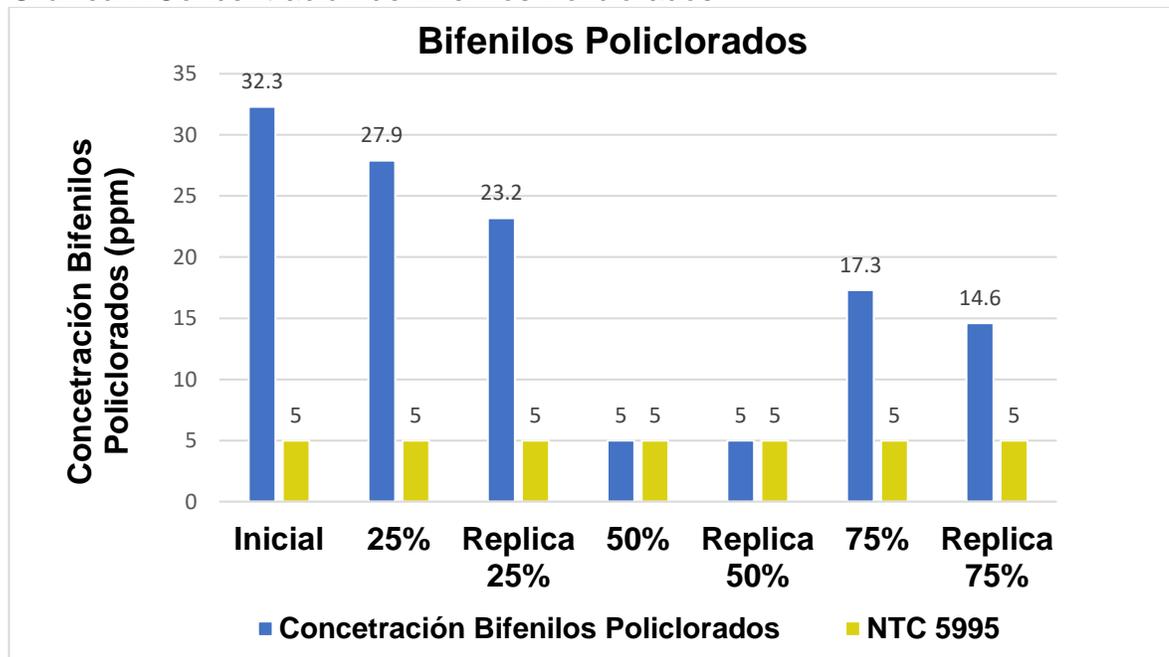
4.2.2 Evaluación Cuantitativa del tratamiento biológico. Con el fin de evaluar la disminución de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales en el aceite lubricante de motor usado fue necesario llevar a cabo un análisis cuantitativo de dichos contaminantes. Por lo cual, las muestras acondicionadas según el proceso planteado en la sección 4.1.3 son enviadas al Laboratorio Texas Oil Tech quien realizó la cuantificación de estas impurezas, la técnica por la cual se llevo a cabo este estudio se encuentra descrita en la sección 2.2.9 y 2.2.10 respectivamente.

4.2.2.1 Resultados del tratamiento. Los resultados arrojados por el Laboratorio especializado Texas para cada una de las alternativas y su respectiva replica se presentan del **ANEXO N** al **ANEXO S**. Con base en dichos resultados se realizaron

las siguientes graficas que muestran la concentración final del contaminante en cada alternativa y la comparación con la norma respectiva.

La gráfica 7 representa la concetracion final de bifenilos policlorados para cada alternativa y su respectiva replica en comporación con la norma NTC 5995, la cual indica el valor máximo permitido de este contaminante en los aceites lubricantes usado de motor.

Gráfica 7.Concentración de Bifenilos Policlorados



Fuente: elaboración propia.

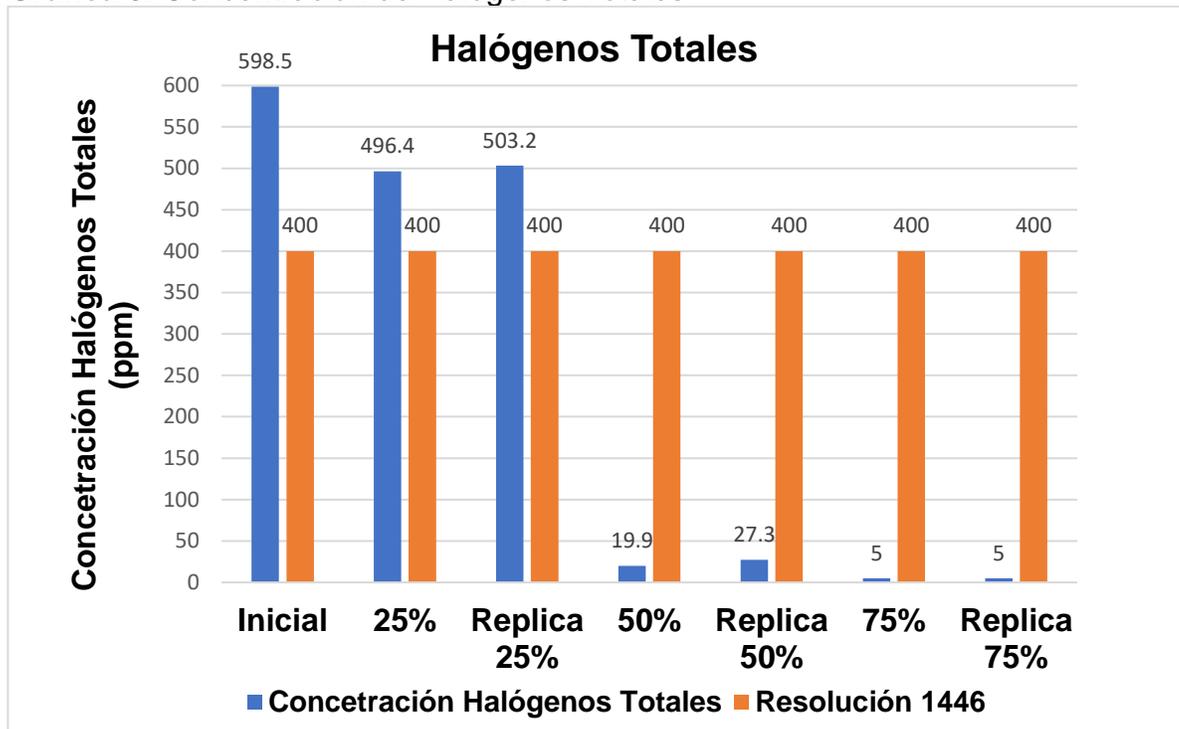
Para el análisis cuantitativo de Bifenilos Policlorados se tiene como referencia la norma NTC 5995 la cual establece los requisitos que deben cumplir las bases lubricantes re-refinadas obtenidas a partir de aceites lubricantes usados¹⁸³. Con base en lo anterior, la gráfica 7 muestra como la alternativa 1 (25% inoculo/ 75% ALU) y su respectiva replica disminuyen los niveles de este contaminante respecto a la concentración inicial, sin embargo no cumplen con los parámetros establecidos para esta impureza, es decir, la concentración final de Bifenilos Policlorados luego del tratamiento biológico supera el valor máximo permitido de 5 ppm; lo mismo sucede para la alternativa 3 (75% inoculo/ 25% ALU) y su réplica, aunque la remoción es mayor que en la 1 aún no alcanza el valor requerido. Para este caso, la alternativa 2 (50% inoculo/ 50% ALU) produce la mayor remoción de Bifenilos Policlorados siendo la única que alcanza el valor solicitado. A pesar de que todos

¹⁸³ INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Petróleo y sus derivados. bases lubricantes re-refinadas. NTC 5995. Bogotá D.C.: La entidad, 2013. p 8.

los tratamientos desarrollados removieron el contaminante en cierta medida solo la alternativa 2 cumple con lo estipulado en la norma, por tal razón si de remoción de Bifenilos Policlorados se trata la mejor alternativa será 50% inoculo/ 50% ALU.

En la siguiente gráfica se evidencia la concentración final de Halógenos Totales para cada alternativa y su respectiva replica en comparación con la norma correspondiente, que indica el valor máximo permitido de este contaminante en los aceites lubricantes de motor usado

Gráfica 8. Concentración de Halógenos Totales



Fuente: elaboración propia.

Partiendo de la gráfica 8 y con base en la resolución 1446 que establece los límites máximos de contaminantes presentes en los aceites usados tratados¹⁸⁴, se puede precisar que la alternativa 1 (25% inoculo/ 75% ALU) a pesar de que genera disminución en los niveles del contaminante, no cumple con la norma ya que la concentración final tanto de la prueba original como de la réplica superan el valor máximo permitido de Halógenos Totales. Por otro lado, una vez terminado el

¹⁸⁴ REPUBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Resolución 1446 (09, 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: Congreso de la República de Colombia. Bogotá D.C. 2005. 3 p.

tratamiento biológico la alternativa 2 (50% Inoculo/ 50 % ALU) y la alternativa 3 (75% Inoculo/ 25 % ALU) generan una disminución considerable de dicho contaminante, cumpliendo con la concentración adecuada para los aceites lubricantes tratados, es decir, se encuentran por debajo de las 400 ppm de este contaminante. Sin embargo, cabe resaltar que la alternativa 3 removió en mayor cantidad esta impureza por lo cual sería la mejor opción si de remoción de Halógenos Totales se tratara.

Con base en la Resolución 1446 y en la norma NTC 5995 la alternativa más adecuada para llevar a cabo el procedimiento de biorremediación del aceite lubricante usado de motor es la 2, debido a que los resultados indican que luego de llevar a cabo el contacto directo a una proporción de 50% ALU y 50% Medio e inoculo los Bifenilos Policlorados Y Halógenos Totales son removidos de tal forma que cumplen con los requisitos establecidos para los aceites lubricantes tratados.

4.2.2.2 Porcentaje de remoción. En cada uno de los experimentos realizados para cada alternativa se presentó disminución de los contaminantes, por lo cual se hace necesario obtener un porcentaje de remoción que indique puntualmente cuanto removió cada uno.

- Porcentaje de remoción para Bifenilos Policlorados.

$$\% \text{ Remoción Bifenilos} = \left(\frac{Ci \text{ Bifenilos} - Cf \text{ Bifenilos}}{Ci \text{ Bifenilos}} \right) * 100\%$$

Dónde: Ci: Concentración inicial de Bifenilos, Cf: Concentración final de Bifenilos

- Porcentaje de remoción para Halógenos Totales.

$$\% \text{ Remoción Halógenos} = \left(\frac{Ci \text{ Halógenos} - Cf \text{ Halógenos}}{Ci \text{ Halógenos}} \right) * 100\%$$

Dónde: Ci: Concentración inicial de Halógenos, Cf: Concentración final de Halógenos.

Tabla 10. Porcentaje de remoción de Bifenilos Policlorados.

Muestras	Concentración Bifenilos ppm	% R Bifenilos
25%	27,9	13,62
Replica 25%	23,2	28,17
50%	5	84,52
Replica 50%	5	84,52
75%	17,3	46,44
Replica 75%	14,6	54,80

Fuente: elaboración propia.

Tabla 11. Porcentaje de remoción de Halógenos Totales.

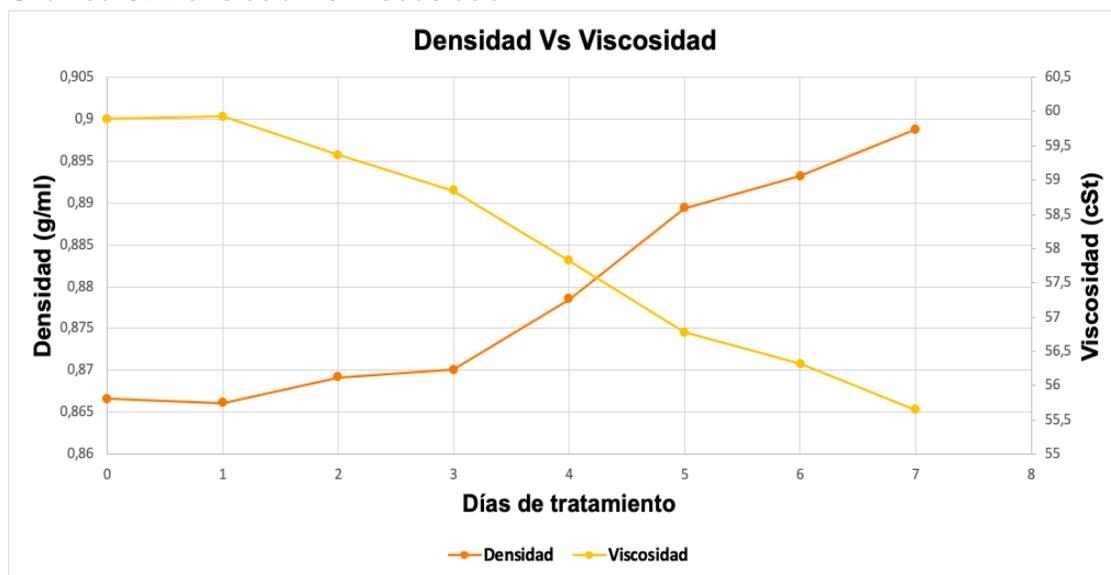
Muestras	Concentración Halógenos ppm	% Remoción Halógenos
25%	496,4	17,06
Replica 25%	503,2	15,92
50%	19,9	96,68
Replica 50%	27,3	95,44
75%	5	99,16
Replica 75%	5	99,16

Fuente: elaboración propia.

El porcentaje de remoción de cada contaminante ratifica lo descrito en el párrafo anterior.

4.2.2.3 Calidad del aceite. Una vez se conoce la alternativa más adecuada para el proceso de biorremediación, es primordial verificar la calidad del aceite lubricante tratado obtenido por dicha alternativa. Por tal razón es fundamental conocer el comportamiento de variables como viscosidad, densidad y pH, debido a que estas son trascendentales para la reutilización del aceite lubricante tratado. Por ende, durante el tratamiento biológico de contacto directo entre el aceite lubricante usado y el consorcio bacteriano fueron evaluados diariamente estos tres parámetros. En la siguiente grafica se presenta la variación de la densidad y la viscosidad durante el tratamiento biológico desde un valor inicial (día 1) hasta un valor final (día 7).

Gráfica 9. Densidad Vs Viscosidad.



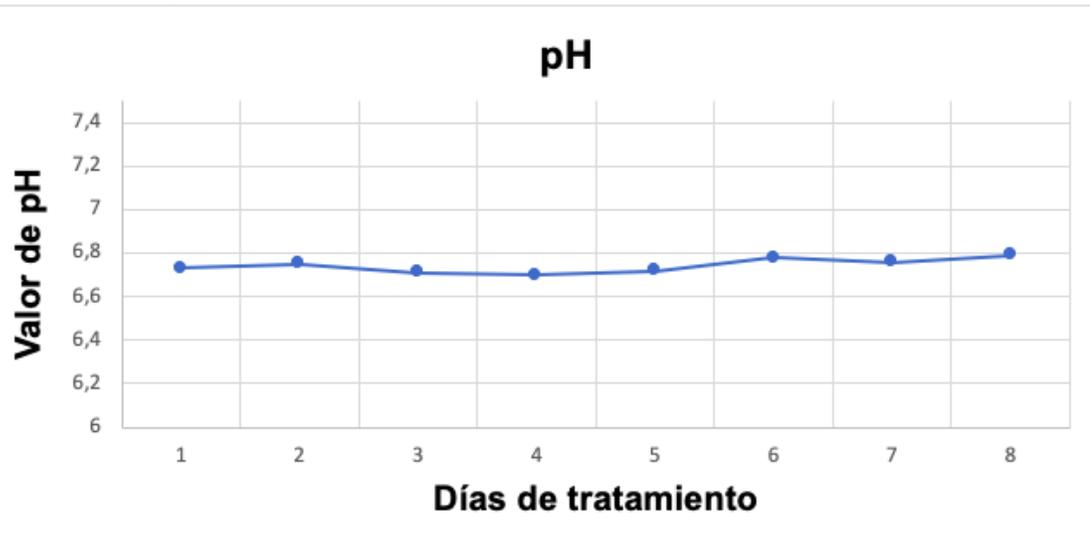
Fuente: elaboración propia.

La grafica evidencia como la densidad aumenta a medida que transcurre el tiempo de tratamiento de un valor inicial de 0,866 g/mL hasta alcanzar un valor de 0,898 g/mL, este incremento se debe al crecimiento exponencial de las bacterias inoculadas (biomasa); mientras la viscosidad muestra un comportamiento contrario, es decir, va disminuyendo con el paso de los días desde un valor inicial de 59,88 cSt hasta un valor de 55,64 cSt, esto indica que los microorganismos con los cuales se desarrollan el tratamiento biológico podrían no degradar solamente Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales si no también algunos compuestos quimicos presentes en el aceite.

Lo anterior indica que dichos parámetros se encuentran dentro de lo establecido, es decir, que la calidad del aceite lubricante usado tratado es adecuada para la reutilización según la norma NTC 5995. Sin embargo, se deben estudiar otras variables para poder considerar el aceite tratado como base lubricante re-refinada.

En la gráfica 10 se presenta el comportamiento del pH durante el tiempo de tratamiento, cabe resaltar que dicho pH no tuvo una variación significativa, es decir, se mantiene practicamente constante.

Gráfica 10. pH



Fuente: elaboración propia.

Como se evidencia en la gráfica anterior el pH se encuentra en un valor cercano al valor inicial de 6,73, debido a que tanto el aceite, como el medio manejan un pH neutro por lo cual no se van a generar cambios abruptos en el valor de este.

5. DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIFICACIONES TÉCNICAS PARA EL DISEÑO DE UN BIOREACTOR PARA EL CULTIVO BACTERIANO.

Partiendo de que no se cuenta con la cinética de cada una de las cepas presentes en el consorcio, y sabiendo que el procedimiento para su determinación es bastante complejo y extenso, no se tiene dentro del alcance de este proyecto.

Por lo anterior, en este capítulo se describen únicamente las especificaciones técnicas que debería cumplir el biorreactor para el crecimiento adecuado del consorcio bacteriano aislado. Para esto, se tienen en cuenta aspectos importantes tales como: modo de operación, clase de biorreactor, variables de interés, sistemas de medida y control, agitación y materiales óptimos para la construcción, entre otros.

5.1 MODO DE OPERACIÓN DEL BIORREACTOR

El modo de operación para el biorreactor juega un papel importante debido a que esto repercute directamente en la eficiencia del proceso al igual que en los costos de construcción y operación.

Por tal razón, al evaluar el proceso se opta por un biorreactor tipo batch o discontinuo debido a que no se requiere adición de nutrientes o extracción de biomasa durante el tiempo de residencia, es decir, los reactivos con cargados únicamente al inicio de la operación y por lo tanto el volumen se mantiene constante¹⁸⁵. De igual forma este tipo de biorreactor presenta grandes ventajas puesto que su operación es sencilla, es versátil, con facilidad de limpieza y mantenimiento, entre otras.

5.2 VARIABLES DE INTERES

Con el fin de obtener la tasa máxima de crecimiento bacteriano en el biorreactor es necesario analizar y determinar las variables que pueden afectar directa o indirectamente el crecimiento de los microorganismos. A fin de establecer dichas variables de forma adecuada se tomó como base el principio de semejanza enunciado por Newton, el cual establece que: “la configuración espacial y temporal de un sistema físico, se determina por relaciones de magnitud dentro del sistema mismo y no depende del tamaño del sistema ni de las unidades de medida en las cuales se miden esas magnitudes”¹⁸⁶; en otras palabras, se asume que el comportamiento en el biorreactor será similar al desarrollado en el laboratorio. Por tal razón, las variables se establecen partiendo de las condiciones a las cuales se realizó la experimentación y que fueron adecuadas para la misma.

¹⁸⁵ GUILERA, Javier. Op, Cit., p, 35.

¹⁸⁶ *Ibíd.*, p. 35

A continuación, se describen cada una de estas variables:

5.2.1 Temperatura. La temperatura es una de las variables más importantes debido a que esta ejerce gran influencia en el desarrollo y la estabilidad microbiana. Esta variable afecta directamente la velocidad de crecimiento y por tanto a la generación del cultivo bacteriano.

La importancia de la temperatura óptima radica en las temperaturas cardinales¹⁸⁷, ya que por debajo de la temperatura mínima no existe crecimiento celular, y, por el contrario, a una temperatura muy elevada las proteínas de las bacterias se desnaturalizan y por tanto los microorganismos mueren. Por ende, por encima de la temperatura mínima el crecimiento bacteriano va aumentando proporcionalmente hasta alcanzar la temperatura óptima en donde las reacciones metabólicas catalizadas por enzimas llegan a su punto más favorable, es decir, a dicha temperatura los microorganismos tienen su tasa máxima de crecimiento posible¹⁸⁸.

Para el desarrollo de la investigación se determinó la temperatura óptima para el crecimiento microbiano del consorcio, esto con base en la experimentación y en las temperaturas óptimas de las cepas presentes en el mismo. Como se evidencia en el cuadro 11 la temperatura óptima de dichas cepas se encuentra dentro de un rango de 35 – 37 °C, debido a esto se optó por escoger una temperatura intermedia de 36 °C para que exista crecimiento bacteriano de todas y cada una de las cepas aisladas.

Para alcanzar la temperatura propuesta, se implementa una chaqueta de calentamiento la cual absorbe o transfiere calor a el biorreactor gracias al principio de conducción, es decir, el calor es transferido a través del material fijo¹⁸⁹; esta puede ser construida con el mismo material dispuesto para la construcción del biorreactor debido a que la temperatura que se requiere alcanzar no es muy elevada.

Estos equipos de transmisión de calor son altamente utilizados en los sistemas de laboratorio o en sistemas de pequeña escala, debido a que dichos intercambiadores proporcionan una suficiente área de transferencia¹⁹⁰. Por lo anterior, son capaces de mantener homogénea la temperatura en todos los puntos del biorreactor durante el proceso, lo cual juega un papel muy importante a la hora de trabajar con

¹⁸⁷ UNIVERSIDAD DE GRANADA. Efectos de agentes físicos. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 10, junio, 2019]. Disponible en: https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm#_Toc59451619

¹⁸⁸ *Ibíd.*, p. 3.

¹⁸⁹ DORAN, Pauine. Principios de Ingeniería de los bioprocesos. España: Acribia, S.A., 1998, 171-365. ISBN 84-200-0853-2.

¹⁹⁰ *Ibíd.*, p. 305.

microorganismos debido a que esta variable afecta directamente el crecimiento de la población.

La chaqueta consta de una entrada de alimentación donde ingresa el agua de calentamiento que va a suministrar la energía necesaria para alcanzar dicha temperatura (36 °C), de igual forma tiene una salida de agua la cual deberá ser conectada a un baño termostataado para el control de esta variable durante el proceso.

Se opta por este sistema de calentamiento debido a que es de fácil acceso y fácil control, de igual forma al tratarse de un volumen pequeño este sistema no tendrá un costo muy elevado.

5.2.2 Presión. La presión es una variable de gran importancia en el planteamiento del biorreactor. Sin embargo, para este caso la presión dentro del biorreactor permanece constante debido a que este no tiene entradas ni salidas que hagan que la presión aumente o disminuya; de igual forma la generación de gases o toxinas por parte de los microorganismos es despreciable, por tanto, dicha variable se mantiene en un valor equivalente a la presión atmosférica.

5.2.3 pH. La mayoría de las bacterias pueden crecer dentro del margen de pH de su medio, conservando un pH interno óptimo constante; las bacterias neutrófilas pueden modificar el pH de medio para neutralizarlo, acidificando o alcalinizando el medio¹⁹¹.

Como se muestra en el cuadro 11, el rango de pH para cada una de las cepas presentes en el consorcio varía desde 6 hasta 8, es decir, las bacterias son consideradas neutrófilas. Por tal razón, al realizar la experimentación las cepas se desarrollaron en un medio de cultivo neutro, el cual no mostro ningún cambio significativo de pH durante el crecimiento. Por ende, el biorreactor debe permanecer en el rango establecido con el fin de evitar inhibición o muerte de los microorganismos. De estar por encima o por debajo la concentración de iones de hidrogeno afectaría directamente la actividad enzimática y por ende la velocidad de crecimiento microbiano.

5.2.4 Presencia de Oxígeno. Los requerimientos de oxígeno de una bacteria muestran el tipo de metabolismo productor de energía de acuerdo a la relación con el oxígeno¹⁹². Algunas bacterias no necesitan oxígeno para vivir, pueden hacerlo en ausencia total o parcial de este.

Al realizar el aislamiento del consorcio bacteriano se realizaron pruebas bajo condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, de las cuales se pudo observar un

¹⁹¹ UNIVERSIDAD DE GRANADA. Op. Cit., p. 5.

¹⁹² MORENO, Erika y VANEGAS, Daniel. Op, Cit., p. 20.

crecimiento más rápido y con mayor biomasa en estado de aerobiosis. Con base en el cuadro 11 y en la experimentación realizada se puede concluir que el biorreactor debe trabajar con suministro de oxígeno (aireación por burbujeo) para lograr un mejor rendimiento, el cual debe ser bombeado continuamente al cultivo para generar una mayor solubilidad.

Con base en esto, para obtener el oxígeno necesario para el crecimiento celular es preciso utilizar un compresor con el fin de aprovechar el oxígeno presente en el aire, cuando este es bombeado pasa a través de una manguera que actúa como vehículo para el paso del oxígeno, dicha manguera estará conectada a un filtro hidrófobo que gracias al tamaño del poro impedirá el ingreso de cualquier clase de contaminante incluido el paso de cualquier otro tipo de bacteria, este último a su vez está conectado a una manguera de silicona que entra al biorreactor por la parte superior que estará unida a un difusor de burbuja finas en forma de disco, el cual desplazara lentamente una gran cantidad de burbujas pequeñas desde la base del tanque hacia la superficie del mismo, este tipo de difusor fue escogido debido a que tiene una alta eficiencia de aireación y transferencia de oxígeno, requiere una menor energía para su funcionamiento y son fácilmente adaptables¹⁹³. Este sistema de aireación hace parte del sistema de agitación del biorreactor.

Ilustración 11. Difusor de burbujas finas para el biorreactor.



Fuente: AGUAMARKET. Difusor de burbuja fina. [Sitio WEB]. Santiago de Chile. La entidad. [16, agosto, 2019]. Disponible en: <https://www.iagua.es/noticias/espana/barmatec/16/09/16/cual-es-diferencia-uso-difusores-burbuja-fina-o-burbuja-guesa>

¹⁹³ IAGUA. Difusores de burbuja fina. [Sitio WEB]. Madrid, España. La entidad. [16, agosto, 2019]. Disponible en: <https://www.iagua.es/noticias/espana/barmatec/16/09/16/cual-es-diferencia-uso-difusores-burbuja-fina-o-burbuja-guesa>

5.2.5 Agitación. El biorreactor planteado para el crecimiento adecuado del cultivo bacteriano mixto requiere un sistema de agitación que permita la dispersión del oxígeno en la solución de nutrientes, que favorezca la homogenización del medio para igualar la temperatura, pH y la concentración de nutrientes en todo el biorreactor. Sin embargo, dicha de agitación no debe ser excesiva debido a que esto puede causar aumento en la temperatura o rompimiento de las células¹⁹⁴.

Por ello, se opta por implementar un sistema de agitación neumática “air-lift” basado en la inyección de aire por la parte inferior del biorreactor proporcionando a su vez una fuente de aireación para la difusión de oxígeno en el medio como se explica en la sección anterior 6.3.3. Este tipo de agitación es adecuado ya que este método cuenta con un corte de cizalla mínimo, disminuyendo así el daño celular. De igual forma los costos energéticos e instrumentales son menores.

A pesar de que la agitación neumática no genera una velocidad excesiva, es necesario implementar dos laminas verticales unidas a la pared del contenedor, mejor conocidas como baffles; estas laminas se encargan de reducir los vórtices que se pueden generar en el líquido¹⁹⁵.

5.2.6 Nivel. El nivel es otra variable a tener en cuenta para el desarrollo del biorreactor debido a que este permite evaluar si existen pérdidas de medio o de biomasa en el sistema. Sin embargo, en este caso no es necesario medirla ni controlarla ya que partiendo de las pruebas realizadas en el laboratorio se dedujo que el nivel no varía durante el tiempo de residencia; lo anterior debido a que al trabajar en un reactor batch no existen entradas ni salidas que permitan que este varíe.

5.2.7 Tiempo de residencia. El tiempo de residencia es una variable importante debido a que de ella depende la cantidad y calidad de biomasa generada, puesto que en un tiempo de residencia muy amplio se envejece el cultivo, es decir, los microorganismos pierden sus propiedades de remoción; y por el contrario un tiempo muy corto no permite un desarrollo adecuado de las bacterias, por lo cual, la generación de biomasa es baja.

Con base en el principio de semejanza ya mencionado, en el tiempo de crecimiento de cada cepa y en la experimentación realizada en el laboratorio se determina un tiempo de residencia equivalente a 48 horas ya que a este tiempo se presenta una alta carga bacteriana para realizar el proceso posterior (biorremediación).

¹⁹⁴ *Ibíd.*, p. 21.

¹⁹⁵ SLIDESHARE. Tipos de fermentadores y sus partes. [Sitio WEB]. México. Universidad Tecnológica de Tecámac. [Consultado 15, julio, 2019]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/luisbryang/tipos-de-fermentadores-y-sus-partes>

5.3 SISTEMAS DE CONTROL

Para alcanzar el correcto funcionamiento del biorreactor es necesario incorporar sistemas de medida y control que permitan mantener las variables en el valor deseado.

- Temperatura: el sistema implementado para la medición de temperatura del cultivo se basa en un termostato, debido a que es uno de los instrumentos más utilizados en la industria no solo por su alta precisión, fácil manejo, fácil esterilización sino también por su bajo costo.

Esta termostato debe estar ubicada en contacto directo con el medio para que brinde un valor con mayor exactitud; dicho valor es enviado a un controlador de temperatura encargado de comparar la señal recibida con un valor ya establecido (Consigna = 36°C) y efectuar la operación correspondiente, es decir, hacer que se active el sistema de calentamiento electrónico si la temperatura está por debajo de los 36 °C ($T \leq 35,9 \text{ °C}$) y por el contrario que se desactive si la temperatura se encuentra por encima de los 36 °C ($T \geq 36,1 \text{ °C}$). Este sistema de control es conocido como On/Off.

- pH: durante la experimentación se evidencio que el valor de pH permanece dentro del rango óptimo de crecimiento de las cepas, es decir, no existe un cambio abrupto de pH que requiera ser corregido. Sin embargo, se opta por implementar un sensor de pH que permita monitorear que esta variable permanezca dentro del rango adecuado.

5.4 VOLUMEN Y DIMENSIONES DEL BIORREACTOR PARA EL CULTIVO BACTERIANO

Para la determinación del volumen del biorreactor es importante tener en cuenta el tamaño del sistema, el cual se estipula partiendo de un factor de escalamiento que es principalmente una medida intuitiva, es decir, la escala es relativa al bioproceso que se desarrolle. Por lo tanto, no se puede definir una escala como grande, mediana o pequeña; sino que cada proceso se sitúa en cualquiera de ellas dependiendo el volumen relativo de producción.

Con base en lo anterior, se establece que el volumen del líquido presente en el biorreactor será equivalente a 5 litros, puesto que este valor es considerado como escala piloto según parámetros establecidos por el Tecnoparque del Sena debido a la cantidad de aceite lubricante usado dispuesto para tratar.

Con base en el volumen del líquido se debe determinar el volumen total del biorreactor, para ello, es necesario conocer primero la cantidad de inóculo y de medio de dilución; la cual se establece partiendo de la heurística que indica que el

volumen del inoculo corresponde al el 8%¹⁹⁶ de volumen diluido; cómo se puede observar en las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1. Volumen del inóculo.

$$V_{Inoculo} = V_D * 0,08$$

Fuente: Universidad Abierta y a Distancia de México. Ingeniería de Biorreactores II. [Sitio WEB]. México: La entidad. [Consultado el Julio, 2019]. Disponible en: [https://issuu.com/jazina ruizhernandez/docs / unidad_2._ biorreactores _ especificos](https://issuu.com/jazina_ruizhernandez/docs/unidad_2._biorreactores_especificos)

Ecuación 2. Volumen del medio.

$$V_m = V_D + V_{inoculo}$$

Fuente: Universidad Abierta y a Distancia de México. Ingeniería de Biorreactores II. [Sitio WEB]. México: La entidad. [Consultado el Julio, 2019]. Disponible en: [https://issuu.com/jazina ruizhernandez/docs / unidad_2._ biorreactores _ especificos](https://issuu.com/jazina_ruizhernandez/docs/unidad_2._biorreactores_especificos)

Donde, V_m : Es el volumen del medio (Líquido presente), V_D : Es el volumen de la dilución y $V_{inoculo}$: Es el volumen del inoculo.

Reemplazando la ecuación 1 en la ecuación 2 para obtener el volumen diluido se tiene:

$$V_m = V_D + (V_D * 0,08)$$

$$5 L = V_D + (V_D * 0,08)$$

$$5 L = 1,08V_D$$

$$V_D = \frac{5L}{1,08} = 4,63 L$$

¹⁹⁶ Universidad Abierta y a Distancia de México. Ingeniería de Biorreactores II. [Sitio WEB]. México: La entidad. [Consultado el Julio, 2019]. Disponible en: [https://issuu.com/jazinaruizhernandez/docs/unidad_2._ biorreactores _ especificos](https://issuu.com/jazinaruizhernandez/docs/unidad_2._biorreactores_especificos)

De igual forma, remplazando el valor anterior en la ecuación 1 se obtiene el volumen para el inoculo:

$$V_{Inoculo} = 4,6 L * 0,08 = \mathbf{0,37 L}$$

Una vez se cuenta con estos valores claves para el planteamiento del biorreactor, se calcula el volumen total del equipo.

No es favorable utilizar el 100 % de la capacidad total del biorreactor por cuestiones de estabilidad, por tal razón, se sobre entiende que el volumen total debe ser mayor al volumen del líquido presente. Con base en la consideración anterior, se opta por implementar una heurística de trabajo la cual indica que es conveniente establecer un volumen de seguridad equivalente al 30%¹⁹⁷ del volumen del medio líquido, dicho volumen podrá ser utilizado si se requiere aumentar la capacidad producción en cierta medida.

Ecuación 3. Volumen de seguridad.

$$V_s = V_m * 0,3$$

Fuente: Universidad Abierta y a Distancia de México. Ingeniería de Biorreactores II. [Sitio WEB]. México: La entidad. [Consultado el Julio, 2019]. Disponible en: [https://issuu.com/jazina ruizhernandez/docs / unidadad_2._ biorreactores _ especificos](https://issuu.com/jazina_ruizhernandez/docs/unidadad_2._biorreactores_especificos)

Donde V_s : Es volumen de seguridad

$$V_s = 5 L * 0,3$$

$$\mathbf{V_s = 1,5 L}$$

Ahora bien, para calcular el volumen total del biorreactor se calcula a partir de la siguiente expresión:

Ecuación 4. Volumen del Biorreactor.

$$V_{Biorreactor} = V_M + V_s$$

Fuente: Universidad Abierta y a Distancia de México. Ingeniería de Biorreactores II. [Sitio WEB]. México: La entidad. [Consultado el Julio, 2019]. Disponible en: [https://issuu.com/jazina ruizhernandez/docs / unidadad_2._ biorreactores _ especificos](https://issuu.com/jazina_ruizhernandez/docs/unidadad_2._biorreactores_especificos)

¹⁹⁷ Universidad Abierta y a Distancia de México. Op. Cit., p 65.

$$V_{\text{Biorreactor}} = 5 L + 1,5 L$$

$$V_{\text{Biorreactor}} = 6,5 l$$

Una vez se tiene el volumen del biorreactor es posible determinar las dimensiones del equipo, partiendo de la premisa de que se trata de un reactor cilíndrico; por lo cual se deben considerar los siguientes parámetros:

- $A(\text{m}^2)$ = Área de la base del biorreactor
- $D(\text{m})$ = Diámetro de la base del biorreactor
- $r(\text{m})$ = Radio de la base del biorreactor
- $h(\text{m})$ = Altura del biorreactor
- $V_{\text{Biorreactor}}(\text{m}^3)$ = Volumen del biorreactor

Ecuación 5. Área base del biorreactor.

$$A = \pi r^2$$

Fuente: Universidad Abierta y a Distancia de México. Ingeniería de Biorreactores II. [Sitio WEB]. México: La entidad. [Consultado el Julio, 2019]. Disponible en: https://issuu.com/jazina_ruizhernandez/docs/unidad_2._biorreactores_especificos

Ecuación 6. Radio del biorreactor.

$$r = \frac{D}{2}$$

Fuente: Universidad Abierta y a Distancia de México. Ingeniería de Biorreactores II. [Sitio WEB]. México: La entidad. [Consultado el Julio, 2019]. Disponible en: https://issuu.com/jazina_ruizhernandez/docs/unidad_2._biorreactores_especificos

Sustituyendo la ecuación 6 en la ecuación 5 se obtiene:

$$A = \pi \left(\frac{D}{2}\right)^2$$

$$A = \pi \frac{D^2}{4}$$

El volumen del reactor se encuentra en función del área y de la altura como lo representa la siguiente ecuación:

Ecuación 7. Volumen del biorreactor en función de base y de altura.

$$V_{Biorreactor} = A * h$$

Fuente: Universidad Abierta y a Distancia de México. Ingeniería de Biorreactores II. [Sitio WEB]. México: La entidad. [Consultado el Julio, 2019]. Disponible en: https://issuu.com/jazina_ruizhernandez/docs/unidad_2._biorreactores_especificos

Ahora se reemplaza la ecuación 6 en la ecuación 7 y se obtiene:

$$V_{Biorreactor} = \pi \frac{D^2}{4} * h$$

Existen un criterio que habla acerca de la proporcionalidad entre la altura y el diámetro del biorreactor, la cual es (D: h) es (2:1), entonces:

$$h = 2D$$

$$V_{Biorreactor} = \frac{\pi}{4} D^2 * 2D$$

$$V_{Biorreactor} = \frac{\pi}{2} D^3$$

Despejando el diámetro de la expresión anterior se tiene:

$$D = \sqrt[3]{\frac{2V_{Biorreactor}}{\pi}}$$

$$D = \sqrt[3]{\frac{2 * 0,0065m^3}{\pi}}$$

$$D = 0,161 m$$

Calculando el resto de los parámetros que se deben considerar se tiene:

- $h = 2(0,161 m)$
 $h = 0,322m$

- $A = \pi \frac{0,161m^2}{4}$
 $A = 0,0203 m^2$
- $r = \frac{0,161 m}{2}$
 $r = 0,0805$

Partiendo de lo anterior, se obtiene la altura del líquido por medio de la siguiente expresión:

$$h_l = \frac{v_l}{r^2 * \pi}$$

$$h_l = \frac{0,005}{(0,0805)^2 * \pi} = 0,246 m$$

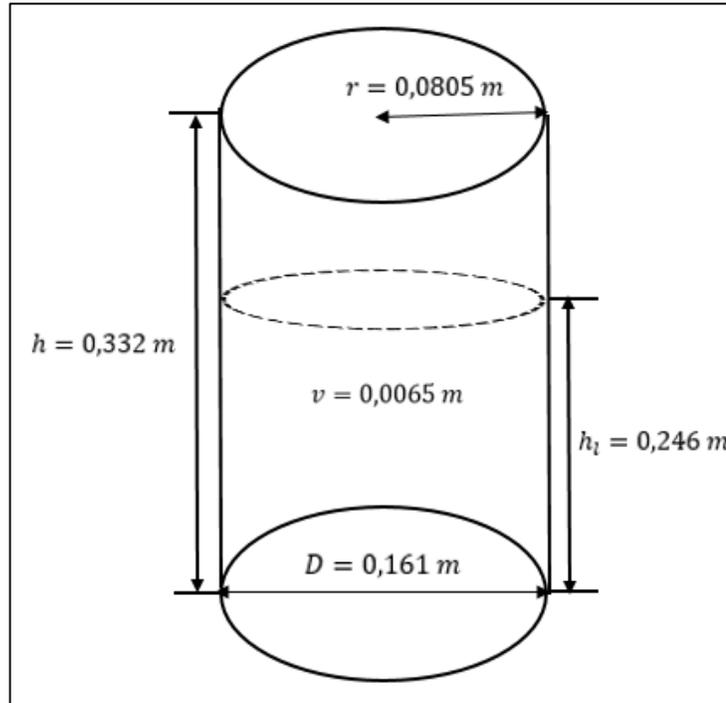
A continuación, se muestra la tabla resumen de las dimensiones del biorreactor:

Tabla 12. Dimensiones del Biorreactor.

Abreviatura	Dimensiones	Valores	Unidades
A	Área de la base del biorreactor	0,0203	m ²
D	Diámetro de la base del biorreactor	0,161	m
r	Radio del biorreactor	0,0805	m
h	Altura del biorreactor	0,322	m
h_l	Altura del liquido	0,246	m
V_{Biorreactor}	Volumen del biorreactor	0,0065	m ³

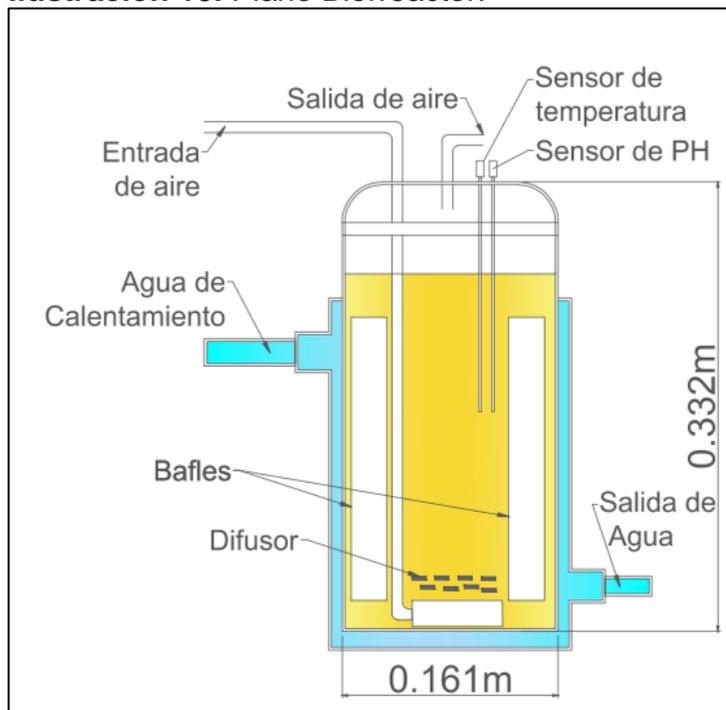
Fuente: elaboración propia.

Ilustración 12. Biorreactor con sus dimensiones.



Fuente: elaboración propia.

Ilustración 13. Plano Biorreactor.



Fuente: elaboración propia.

5.5 PROPORCION DE REACTIVOS.

Como ya se mencionó anteriormente, gracias al principio de semejanza que indica similitud de comportamiento se opta por guardar las proporciones trabajadas a escala laboratorio de cada uno de los reactivos y cepas.

- Medio de cultivo: para obtener la nueva cantidad de caldo nutritivo que es necesario proporcionar al medio, se multiplica el volumen de dilución por la proporción de este que es de 8g/l¹⁹⁸.

$$\text{Proporción de caldo nutritivo} = 4,63 \text{ L} * \frac{8g}{L}$$

$$\text{Proporción de caldo nutritivo} = 37,04g$$

- Inoculo: De igual manera se obtiene la cantidad de caldo nutritivo para el inoculo.

$$\text{Proporción de caldo nutritivo} = 0,37 \text{ L} * \frac{8g}{L}$$

$$\text{Proporción de caldo nutritivo} = 3 \text{ g}$$

Se inoculan las cuatro cepas en una cantidad exacta de medio, es decir, en 0,0925 L de medio nutritivo para cada una. La concentración celular del inoculo es considerada una propiedad intrínseca por lo cual no varía respecto a la determinada en el laboratorio, se mantendrá en un valor de $24 * 10^6$ N° bacterias/mL.

Entonces, para obtener la carga bacteriana presente en el biorreactor, se hace uso de la siguiente expresión:

$$\text{Carga bacteriana} = \text{Concentracion celular} * V_{\text{inoculo}}$$

$$\text{Carga bacteriana} = 24 * 10^6 \text{ N}^\circ \text{ bacterias/mL} * 370 \text{ mL}$$

$$\text{Carga bacteriana} = 88,8 * 10^8 \text{ N}^\circ \text{ bacteria}$$

¹⁹⁸ LABORATORIOS BRITANIA, S. A. Caldo nutritivo. [Sitio WEB]. Argentina: La entidad. [Consultado 15, Julio, 2019]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2844b49b1c6.pdf

5.6 MATERIALES DEL BIORREACTOR PARA EL CULTIVO BACTERIANO

En la selección del material adecuado para el biorreactor planteado, se tienen en cuenta varios aspectos para cumplir con los requerimientos necesarios que permiten el correcto funcionamiento del equipo. Para la revisión de los posibles materiales a utilizar, se consultaron referentes bibliográficos que brindan información sobre que materiales más usados actualmente en la construcción de biorreactores.

Cada una de las alternativas preseleccionadas con base en la literatura se describen en el cuadro 14 y se evalúan mediante una serie de criterios de selección que se consideraron, investigaron, compararon y calificaron por medio de una matriz de selección.

Cuadro 14. Características de los materiales preseleccionados.

Material	Descripción
Acero Inoxidable	El acero es una aleación (mezcla) de hierro (Fe) y carbono (C) siempre que el porcentaje de carbono sea inferior al 2%, por tanto, el acero es considerado un metal ferroso. El hierro presente en este material al entrar en contacto con el oxígeno del aire forma óxidos de hierro que deterioran el acero, para evitar este fenómeno se añade una proporción de cromo ya que el cromo tiene gran afinidad con el oxígeno y reacciona con él. El acero inoxidable tiene grandes propiedades como, por ejemplo: resistencia a la corrosión y la oxidación, resistencia al calor, reciclable, fácil fabricación y limpieza, bajo coste, biológicamente neutro y buena estética ¹⁹⁹ .
Vidrio Borosilicato	El vidrio es un material cerámico amorfo, completamente inorgánico, duro y frágil a la vez. Generalmente es transparente, aunque la tonalidad puede variar dependiendo la composición química con la que haya sido fundido ²⁰⁰ . El vidrio de Borosilicato, es un vidrio tratado para resistir altas temperaturas y de igual forma adquiere ciertas propiedades como: altamente resistente a la corrosión, sin poros, transparente, suave, sin efecto catalítico, anti inflamable y sustentable ²⁰¹ .

¹⁹⁹ ÁREA TECNOLÓGICA. Acero inoxidable. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 15, junio, 2019]. Disponible en: <https://www.areatecnologia.com/materiales/acero-inoxidable.html>

²⁰⁰ ECOADMIN. Vidrio. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado el Jun, 2019]. Disponible en: <https://www.ecologiahoy.com/vidrio>

²⁰¹ DE DIETRICH. Las propiedades del vidrio de borosilicato. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 15 junio, 2019]. Disponible en: <https://www.dedietrich.com/es/soluciones-y-productos/esmalte-vidrio-de-borosilicato/las-propiedades-del-vidrio-de-borosilicato>

Cuadro 14. (Continuación)

Material	Descripción
Policloruro de Vinilo (PVC)	<p>El PVC es un material termoplástico que inicia su proceso de ablandamiento por encima de los 95 °C y cuenta con las siguientes características²⁰²:</p> <ul style="list-style-type: none">• Es compatible con otros aditivos que pueden proporcionar claridad o color al PVC, rigidez o flexibilidad, etc.• Excelente aislante eléctrico.• Fuerza contra impactos y resistencia a malas condiciones climáticas (No se corroe y es muy duradero).• El PVC es químicamente estable.• Apropiado para ser usado como un material de construcción.• Resistente a grasas, aceites y productos químicos.
Polipropileno (PP)	<p>El polipropileno es un polímero perteneciente al grupo de termoplásticos muy duro y resistente, que se conoce con las siglas PP. Es un material opaco y con gran resistencia al calor, pues empieza su proceso de ablandamiento a temperaturas superiores a los 150 °C. De igual forma es un plástico muy resistente a los golpes y a la corrosión²⁰³.</p> <p>Adicional es esto, el polipropileno es un material de bajo costo, altamente utilizado en la industria de alimentos (inodoro y no tóxico), es resistente a la flexión y a la fatiga, químicamente inerte, esterilizable y reciclable²⁰⁴.</p>

Fuente: elaboración propia.

5.6.1 Matriz de selección. Para llevar a cabo la selección del material apropiado que cumpla con los requerimientos del sistema para el caso planteado, se evaluaron las alternativas revisadas a través del tipo de matriz de selección de Pugh, la cual es una técnica cuantitativa utilizada para evaluar y optar por una de las posibles

²⁰² LENNTECH. Cloruro de Polivinilo (PVC). [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado el Jul, 2019].

²⁰³ QUIMINET. Polipropileno. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 15, julio, 2019]. Disponible en: <https://www.quiminet.com/articulos/todo-acerca-del-polipropileno-4455.htm>

²⁰⁴ Canal Construcción. Polipropileno usos y características. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 15, julio, 2019]. Disponible en: <http://canalconstruccion.com/polipropileno-usos-y-caracteristicas.html>

opciones²⁰⁵. Los criterios más relevantes para tomar la decisión son explicados a continuación, y se analizaron para cada una de las alternativas preseleccionadas.

5.6.2 Criterios de selección. Para determinar criterios de selección confiables que permitan escoger el material adecuado para el biorreactor es indispensable realizar una búsqueda bibliográfica exhaustiva, por medio de la cual es posible identificar cuáles son los aspectos de mayor importancia para cumplir con los requerimientos establecidos para el equipo. Los criterios escogidos para evaluar las alternativas se explican a continuación.

5.6.2.1 Resistencia a procesos de esterilización. La esterilidad es uno de los parámetros más importantes a la hora de trabajar con microorganismos, por tal razón es importante que el material dispuesto para la construcción del biorreactor planteado sea resistente a temperaturas elevadas ya que el proceso de esterilización se lleva a cabo a una temperatura aproximada de 122°C.

5.6.2.2 Resistencia a la corrosión. Este criterio resulta importante a la hora de evaluar el material adecuado para el biorreactor, debido a que de esto depende la durabilidad del equipo, que tan reiterativo debe ser el mantenimiento y que exista algún tipo de contaminación en el medio a causa de dicha corrosión.

5.6.2.3 Resistencia a los golpes. Esta propiedad es trascendente ya que los biorreactores generalmente están expuestos a ciertos peligros a la hora de su alimentación, mantenimiento y limpieza, entre otros. Además de ello dichos accidentes pueden afectar directamente en la seguridad de quien lo manipule.

5.6.2.4 Material inerte. Este parámetro hace referencia a la importancia de contar con un material inerte, con el fin de evitar reacciones indeseables dentro del biorreactor que causen la inhibición o muerte de los microorganismos.

5.6.2.5 Transparencia. Esta característica no es imprescindible a la hora de evaluar los requerimientos del material. Sin embargo, resulta importante debido a que, si el recipiente usado es traslucido permitir el seguimiento del cultivo a simple vista, lo cual facilita su estudio.

5.6.2.6 Costo. Es uno de los criterios más importantes a tener en cuenta para la elección del material óptimo para el desarrollo del biorreactor planteado, ya que al tratarse de un proceso de biorremediación se busca generar una alternativa viable y de menor coste que los tratamientos convencionales.

²⁰⁵ PUB, Addison-Wesley. Stuart Pugh. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 15, julio, 2019]. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/3322/f6fbf0e06c7f993887a00ee6001e7e6811ff.pdf>

5.6.3 Resultado de la matriz de selección. Cada uno de los criterios descritos anteriormente fue calificado mediante tres puntajes iniciales: 0 para el parámetro que no es trascendente en comparación con los otros, -1 si es un criterio desfavorable con respecto a los demás materiales y +1 si predomina entre las alternativas preseleccionadas.

Para cada criterio es establecida una ponderación según el orden de importancia, las opciones fueron puntadas y multiplicadas por su respectivo peso, posteriormente se lleva a cabo la sumatoria para obtener un total para cada material propuesto. En el cuadro 15 presentada a continuación se enseñan los resultados de la matriz de selección Pugh.

Cuadro 15. Matriz de selección para el material del biorreactor.

Criterio	Ponderación	Material			
		Acero inoxidable	Vidrio Borosilicato	Policloruro de Vinilo (PVC)	Polipropileno (PP)
Resistencia a la Esterilización	3	+1	+1	-1	+1
Resistencia a la Corrosión	2	+1	+1	+1	+1
Resistencia a los golpes	2	+1	-1	+1	+1
Material Inerte	2	+1	+1	+1	+1
Transparencia	1	-1	+1	-1	0
Costo	3	-1	-1	0	+1
Total		5	3	2	12

Fuente: elaboración propia.

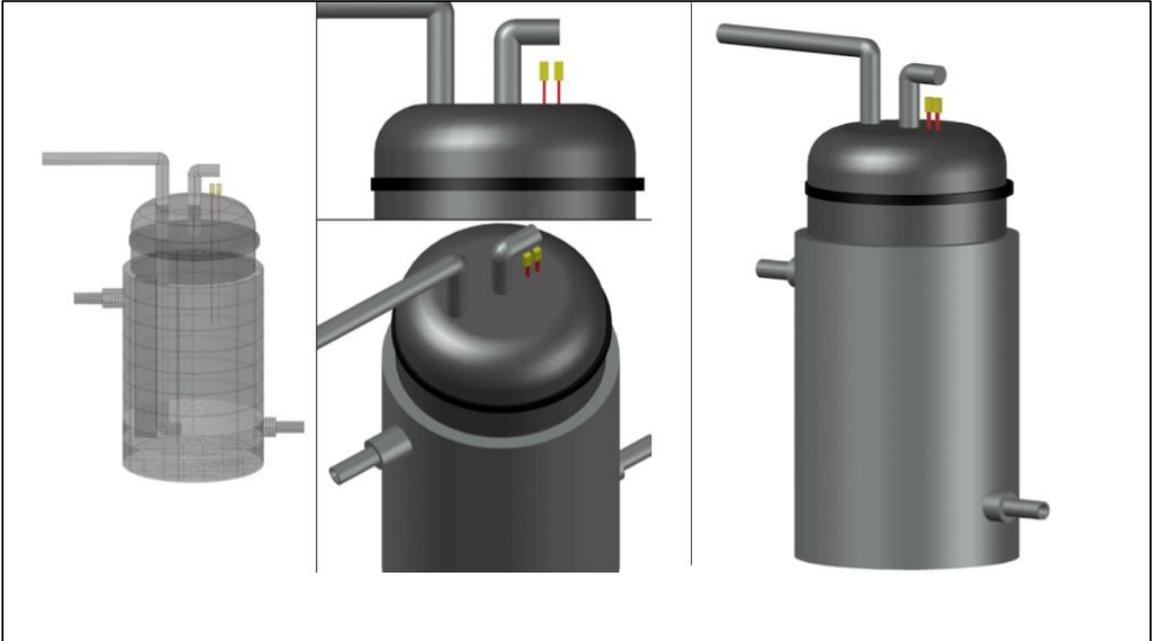
La matriz de selección dio como resultado que el material más adecuado para el desarrollo del biorreactor es el Polipropileno (PP), debido a que cumple con cada uno de los criterios estipulados. El PP se clasifica según la configuración espacial de su estructura molecular, puede ser: isotáctico, atáctico o sindiotáctico²⁰⁶. Lo anterior condiciona el comportamiento del material y le otorga características físicas particulares, por su resistencia, rigidez y transparencia se usa Polipropileno isotáctico.

Sin embargo, si no se cuenta con este material, se encuentra como segunda opción según la matriz realizada el acero inoxidable, siendo este un material bastante completo para la construcción del bioreactor teniendo como única desventaja el costo respecto al polipropileno.

²⁰⁶ UNIVERSIDAD DE BARCELONA. Polipropileno. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 15, julio, 2019]. Disponible en: <http://www.ub.edu/cmematerials/es/content/polipropileno>

En la ilustración 14 se presenta la configuración final del biorreactor para el crecimiento bacteriano determinado a partir de las especificaciones técnicas establecidas anteriormente.

Ilustración 14. Biorreactor para el cultivo bacteriano.



Fuente: elaboración propia.

6. CONCLUSIONES

- Partiendo de la caracterización fisicoquímica inicial realizada se concluyó que los niveles de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales presentes en el aceite lubricante usado sobrepasaban los límites máximos permitidos para ser reutilizado, con una concentración de 32,3 ppm y 598,5 ppm respectivamente, dando lugar a la investigación.
- El consorcio bacteriano aislado del aceite lubricante de motor usado está compuesto por 4 cepas que fueron identificadas como *Bacillus Licheniformis*, *Bacillus Lentus*, *Bacillus Circulans* y *Streptococcus Uberis*, gracias a esto se lograron establecer las condiciones óptimas para el crecimiento bacteriano del cultivo mixto, a una temperatura de 36 °C, un pH neutro y en condición de aerobiosis
- El tratamiento biológico desarrollado permitió la remoción de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales siendo la alternativa 2 la que presento un mejor comportamiento al ser la única que cumplía con la concentración de los dos contaminantes por debajo de la norma. Puntualmente Bifenilos Policlorados con una concentración final de <5 ppm y un porcentaje de remoción del 86,54% y Halógenos Totales con una concentración de 19,9 ppm y un porcentaje de remoción de 96,68%.
- Durante el tratamiento microbiológico se observó un comportamiento particular correspondiente al aumento de la densidad del aceite debido al crecimiento poblacional, lo cual a su vez genera una disminución en la viscosidad ya que existe una mayor degradación de los contaminantes.
- Se determinaron las especificaciones técnicas para el diseño del biorreactor para el crecimiento del cultivo bacteriano, estableciendo parámetros de gran importancia que son la base para el diseño, tales como el modo de operación tipo Batch, el volumen total con un valor equivalente a 6,5 L, condiciones de operación, sistemas de control, dimensiones donde prima la altura del reactor y el diametro del biorreactor con un valor de 0,322m y 0,161m respectivamente, proporciones los reactivos y material de construcción siendo el mas adecuado el polipropileno (PP isotáctico).
- El material determinado para la construcción del biorreactor unicamente podrá ser utilizado para el crecimiento de la población bacteriana debido a que si este material entra en contacto con compuestos diferentes este podría verse afectado.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar el tratamiento microbiológico planteado para el aceite lubricante usado cada cepa por separado y evaluar todos los parámetros establecidos por la norma NTC 5995 y la resolución 1446 de 2005 del ministerio de ambiente para que el aceite pueda ser categorizado como base lubricante re-refinada y posterior a esto pueda ser reutilizado.
- Se recomienda realizar el acoplamiento de diferentes tecnologías que permitan la remoción de contaminantes presentes en el aceite lubricante usado con el fin de obtener un aceite re-refinado y un mayor rendimiento del proceso.
- Es preciso realizar un nuevo estudio a una proporción intermedia entre la alternativa 1 (25% Medio/ 75% ALU) y la alternativa 2 (50% Medio/ 50% ALU), con el fin de evaluar una nueva alternativa que permita realizar la remoción de contaminantes y cumplir con la norma, pero que al mismo tiempo sea posible tratar una mayor cantidad de aceite con menos cantidad de medio inoculado.
- Debido a que no se cuenta con la cinética de cada una de las cepas aisladas e identificadas ni la interacción entre ellas, se recomienda estudiar dicha cinética con el fin de tener bases robustas para elaborar el diseño de un biorreactor para desarrollar el proceso a gran escala.
- Una vez se tiene la cinética de las cepas presentes en el consorcio, es conveniente evaluar el flujo de oxígeno que se debe suministrar para la agitación y aireación del biorreactor y con base en este elegir el compresor adecuado para dicha proporción.
- Se recomienda realizar un estudio de factibilidad para este proyecto, con el fin de evaluar la rentabilidad del tratamiento biológico para los aceites lubricantes usados de motor a escala industrial.
- Debido a que actualmente los aceites lubricantes de desecho son almacenados sin ningún tipo de clasificación, es decir, son despositados todos en un mismo contenedor, es aconsejable realizar una investigación enfocada a la remoción de contaminantes en este tipo de mezclas.
- Es preciso realizar el tratamiento microbiológico con las bacterias aisladas y purificadas en otras referencias de bases lubricantes con el fin de evaluar el comportamiento de los microorganismos y la remoción de contaminantes en dichas referencias.
- Se recomienda realizar una comparación entre los aceites tratados y los bioaceites con respecto a su concentración de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales.

- Se aconseja realizar la caracterización fisicoquímica general al final del tratamiento del aceite lubricante usado, con el fin de determinar si existe degradación de otro tipo de contaminantes.

BIBLIOGRAFÍA

ae Adam. Balanzas Analíticas Nimbus. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://www.adamequipment.com/es/balanzas-analiticas-nimbus>

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. Universidad EAFIT, 2006. p. 24-29.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Test Method for Acid and Base Number by Color-Indicator Titration. Estados Unidos: ASTM, 2004. 1-2 p.

_____. Standard Test Method for Conradson Carbon Residue of Petroleum Products. Estados Unidos: ASTM, 2014. 1 p.

_____. Chlorine in New and Used Petroleum Products (High Pressure Decomposition Device Method). Estados Unidos: ASTM, 2016. 1 p.

_____. Standard Test Method for Low-Temperature Viscosity of Automatic Transmission Fluids, Hydraulic Fluids, and Lubricants using a Rotational Viscometer. Estados Unidos: ASTM, 2017a. 1 p.

_____. Standard Test Method for Determination of Wear Metals and Contaminants in Used Lubricating Oils or Used Hydraulic Fluids by Rotating Disc Electrode Atomic Emission Spectrometry. Estados Unidos: ASTM, 2017b. 1-2 p.

_____. Standard Practice for Condition Monitoring of In-Service Lubricants by Trend Analysis Using Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectrometry. Estados Unidos: ASTM, 2018a. 1 p.

_____. Standard Test Method for Analysis of Polychlorinated Biphenyls in Insulating Liquids by Gas Chromatography. Estados Unidos: ASTM, 2018b. 1 p.

_____. Standard Test Method for Initial pH (i-pH)-Value of Petroleum Products. Estados Unidos: ASTM, 2014. 1 p.

Anonimo. Bacillus Circulans; [Consultado el Mayo,2019]. Disponible en: <http://www.tgw1916.net/Bacillus/circulans.html>

_____. Bacillus lentus. [Consultado el Mayo,2019]. Disponible en: <http://www.tgw1916.net/Bacillus/lentus.html>

Anónimo. Bacillus licheniformis. [Consultado el Abril,2019]. Disponible en: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_licheniformis

ÁREA TECNOLÓGICA. ACERO INOXIDABLE [Consultado el Jun,2019]. Disponible en: <https://www.areatecnologia.com/materiales/acero-inoxidable.html>

Blamis. Frasco Tapa Rosca Azul. [Consultado el Ju,2019]. Disponible en: <https://www.blamis.com.co/product/frasco-tapa-rosca-azul>

BUHELLI,Luis and GARCÍA,Vicente. Detección temprana de fallas en motores de combustión interna a diésel mediante la técnica de análisis de aceite. En: UNEMI. Septiembre 15, .vol. 8, no. 15, p. 84-95

Canal Construcción. Polipropileno usos y características [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <http://canalconstruccion.com/polipropileno-usos-y-caracteristicas.html>

Castro, Fredy, Morales, Cortázar, Trujillo. Investigación Centro de Tecnologías de Transporte (CTT). Bogotá D,C: 2016. 12

Comitronic. INCUBADORAS LINEA KRYOVEN. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <http://www.dies.com.co/wp-content/uploads/2017/12/Incubadoras-Kryoven.pdf>

REPUBLICA DE COLOMBIA. CONVENIO DE BASILEA SOBRE EL CONTROL DE LOS MOVIMIENTOS TRANSFRONTERIZOS DE LOS DESECHOS PELIGROSOS Y SU ELIMINACIÓN". 1996.

DE DIETRICH. LAS PROPIEDADES DEL VIDRIO DE BOROSILICATO. [Consultado el Jun,2019]. Disponible en: <https://www.dedietrich.com/es/soluciones-y-productos/esmalte-vidrio-de-borosilicato/las-propiiedades-del-vidrio-de-borosilicato>

DICORLAB. Tubo de ensayo en vidrio tapa rosca en teflon. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <http://dicorlab.com/tubo-ensayo-vidrio-tapa-rosca-teflon/>

DISTRIBUIDORA COMERCIAL ZOGBI. FILTROS DE CELULOSA [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <http://www.dczogbi.com/filtros.html>

ECOADMIN. Vidrio Enero 1,. [Consultado el Jun,2019]. Disponible en: <https://www.ecologiahoy.com/vidrio>

ENCICLOPEDIA DE SALUD Y SEGURIDAD EN EL TRABAJO. PROPIEDADES DE LOS HALOGENOS Y SUS COMPUESTOS. [Consultado el Marzo,2019]. Disponible

en:

http://www.mitramiss.gob.es/es/publica/pub_electronicas/destacadas/enciclo/general/contenido/tomo4/104-07.pdf

ESCO. Cabina Flujo laminar vertical Streamline - Esco. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: http://www.labbrands.com/vertical/975-cabina-flujo-laminar-vertical-streamline-esco.html#data_sheet

Fisher Scientific. Tubos cónicos para centrifuga Falcon. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/falcon-15ml-conical-centrifuge-tubes-5/p-193301>

FONG,Waldyr; QUIÑONEZ,Edgar and TEJADA,Candelaria. Physical-chemical characterization of spent engine oils for its recycling. En: SCIELO. Jul-Dic.,vol. 15, no. 2, p. 135-144

France. Pipeteador [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <http://www.labbrands.com/auxiliares-manuales-de-cremallera/631-pipeteador-de-cremallera-alla-france.html>

GONZALEZ,Maria; ANGITA,Maria and TORRICO,Gertrudis. MEDIOS DE CULTIVO EN UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. 2012. 42 p.

GUILERA, JAVIER. DISEÑO DE UN BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOSAN ; ESPAÑA.: ETSEIB, 2016. p. 31-49.

Gulf Oil Internacional. MANUAL TÉCNICO GULF. Buenos Aires, Argentina. [Consultado el 09/09/2018]. Disponible en: http://remex.com.ar/descargas_web/1-1%20Gulf%20-%20Manual%20Tecnico%20de%20Lubricantes.pdf

GUTIERREZ, David and PEREZ, Johana. 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 ; Bogota D,C.: Fundación Universidad de América, 2019. p. 24-36.

International Energy Agency. WORLD ENERGY OUTLOOK 2015. [Consultado el 11/09/2018]. Disponible en: <https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/WEO2015.pdf>

Lab Scient. Bacto-Incinerador Resistencia A Temperatura: 825°C± 50°C. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://instrumentalia.com.co/laboratorio-quimico/349-bacto-incinerador-resistencia-a-temperatura-825-50.html>

Laboratorio Clinico. Vidrio de Reloj. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: https://www.ecured.cu/Vidrio_de_Reloj

Laboratorio Quimico. Picnómetro [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://www.ecured.cu/Picn%C3%B3metro>

LABORATORIOS BRITANIA,S. A. Caldo nutritivo [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2844b49b1c6.pdf

LENNTECH. Cloruro de Polivinilo (PVC). [Consultado el Jul,2019].

Lubrication Management. ¿Qué efectos tiene la oxidación en el aceite lubricante? Mayo 11,. [Consultado el Marzo2019]. Disponible en: <http://lubrication-management.com/2017/05/11/que-efectos-tiene-la-oxidacion-en-el-aceite-lubricante/>

MATINS,Marcelo. Verdades y falacias sobre el análisis de sulfatación ¿Puede reemplazar al TBN? [Consultado el Marzo,2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/236996000/Consejo-128-Sulfatacion>

Microkit. Medios de Cultivo. Feb 19,. [Consultado el Abril,2019]. Disponible en: <http://www.medioscultivo.com/dextrosa-glucosa-anhidra-para-microbiologia/>

REPUBLICA DE COLOMBIA. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. MANUAL TÉCNICO PARA EL MANEJO DE ACEITES LUBRICANTES USADOS DE ORIGEN AUTOMOTOR E INDUSTRIAL. Bogotá D.C: 2014. 85 p. ISBN 978-958-8491-87-5

REPUBLICA DE COLOMBIA. Ministerio de Ambiente. LEGISLATIVO. RESOLUCIÓN 1446 DE 2005 (Oct 09,). Bogota D,C.,2015.

REPLUBLICA DE COLOMBIA. Ministerio de Minas y Energia. PROYECCIÓN DE DEMANDA COMBUSTIBLES LÍQUIDOS EN COLOMBIA. [Consultado el 10/09/2018]. Disponible en: <http://www1.upme.gov.co/DemandaEnergetica/Proyccio%CC%81nDemandaL%C3%ADquidos-Rev2016.pdf.p.7>

Mobil Industrial. Lubricantes industriales por aplicación [2019]. Disponible en: <https://www.mobil.com.mx/es-mx/industrial/lubricants/applications>

MORENO, ERIKA and VANEGAS, DANIEL. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN BIORREACTOR ESTERILIZABLE Y DE BAJO COSTO PARA EL ESTUDIO DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS. Bogota D,C.: UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN, 2017. p. 13-19.

Munna, Bhattacharya. Dipa, Biswas. Santanu, Sana. Sriparna, Datta. Biodegradation of waste lubricants by a newly isolated Ochrobactrum sp. C1. 03/03/p. 7

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Petróleo y sus derivados. bases lubricantes re-refinadas. NTC 5995."PETRÓLEO Y SUS DERIVADOS. BASES LUBRICANTES RE-REFINADAS". (Mayo 15,). 2013.

Oxoid. Sistemas Generadores de Atmósfera. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <http://www.analisisavanzados.com/index.php/anaerobiosis>

PADILLA, Noel. ANÁLISIS DE ACEITE PARA DETECCIÓN TEMPRANA DE FALLAS EN MOTORES CATERPILLAR. UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, 2013. p. 100.

PUB, Addison-Wesley. Stuart Pugh Feb,. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/3322/f6fbf0e06c7f993887a00ee6001e7e6811ff.pdf>

QUIMINET. POLIPROPILENO Enero 12,. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://www.quiminet.com/articulos/todo-acerca-del-polipropileno-4455.htm>

QUIOS, SAS. JARRA DE ANAEROBIOSIS. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <http://www.quios.com.co/producto/jarra-de-anaerobiosis/>

ROJAS TRIVIÑO, Alberto. Conceptos y prácticas de Microbiología general Palmira. [Consultado el 28/03/2019]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>

SERNA,Marylin and BARRERA,Isabel. TRABAJO DE GRADO GERENCIA DE VENTAS [Consultado el Marzo,2019]. Disponible en: https://bdigital.uexternado.edu.co/bitstream/001/411/1/AEA-spa-2017-Plan_y_estructura_de_Ventas_Global_O%C3%ADI_aceites_y_lubricantes.pdf

Technical Data. Bushnell Haas Agar. [Consultado el Abril,2019]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M349.pdf>

Tp.Laboratorio Quimico. Probeta. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/probeta-4.html>

___. Embudo Büchner. [Consultado el Julio,2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/embudo-buchner.html>

___. Embudo de Decantación o Balón de Decantación. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/embudo-de-decantacion-o-balon-de-decantacion.html>

___. Espátula. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/espátula-3.html>

___. Gradilla. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/gradilla-3.html>

___. Matraz de Aforo o Matraz Aforado. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/matraz-de-aforo-o-matraz-aforado.html>

___. Matraz Erlenmeyer. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/matraz-erlenmeyer.html>

___. Pipeta. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/pipeta.html>

___. Placa de Petri. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/placa-de-petri.html>

___. Porta Objetos. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/portaobjetos.html>

___. Vaso Precipitado. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/vaso-precipitado.html>

Tuttnauer. Autoclaves automáticos y Semiautomáticos. [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: https://tuttnauer.com/sites/default/files/tta-predegi-sp-autoclave-tuttnauer_0.pdf

Universidad Abierta y a Distancia de México. Ingeniería de Biorreactores II . Abril 18,. [Consultado el Julio,2019]. Disponible en: https://issuu.com/jazinaruizhernandez/docs/unidad_2._biorreactores_especificos

UNIVERSIDAD DE BARCELONA. POLIPROPILENO ; [Consultado el Jul,2019]. Disponible en: <http://www.ub.edu/cmematerials/es/content/polipropileno>

UNIVERSIDAD DE GRANADA. Efectos de agentes físicos ; [Consultado el Jun,2019]. Disponible en: https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm#_Toc59451619

Universidad Tecnológica Nacional. Catedra Nanotecnología. p. 1-8

ANEXOS

**ANEXO A.
INSTRUMENTOS DE LABORATORIO UTILIZADOS DURANTE LA
EXPERIMENTACIÓN**

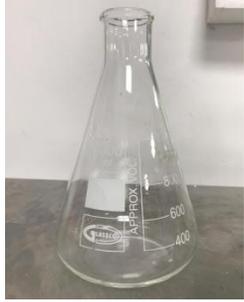
Cuadro 16. Instrumentos utilizados durante la experimentación.

Instrumento	Descripción	Ilustración
<p>Frasco de vidrio ámbar para muestra de ALU con tapón</p>	<p>Fabricado en vidrio soda-calcio-hidrolítica de clase III, con capacidad de 1000 ml. Se utilizó para contener la muestra del aceite lubricante usado de motor.</p>	
<p>Embudo Büchner</p>	<p>El embudo es fabricado normalmente en porcelana sin embargo también existen de plástico y de vidrio, este instrumento ayudo para la filtración del ALU junto con la bomba de vacío y el filtro de celulosa²⁰⁷.</p>	
<p>Papel filtro de celulosa</p>	<p>Son fabricadas de algodón de alta calidad para un contenido alto de celulosa al 98%. Generalmente se retienen partículas tan bajas como 2.5 μm²⁰⁸.</p>	

²⁰⁷ Tp-Laboratorio Químico. Embudo Büchner. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 15, Julio, 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/embudo-buchner.html>

²⁰⁸ DISTRIBUIDORA COMERCIAL ZOGBI. Filtros de celulosa. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 15, julio, 2019]. Disponible en: <http://www.dczogbi.com/filtros.html>

Cuadro 16. (Continuación)

Instrumento	Descripción	Ilustración
Matraz Erlenmeyer	El Erlenmeyer es un recipiente de vidrio que tiene forma de cono y tiene un cuello cilíndrico, es plano por la base. Se utilizó para la esterilización del aceite, la esterilización y preparación del medio y para el contacto directo entre el aceite usado y el medio ²⁰⁹ .	
Placas de Petri	Son recipientes redondos, que pueden ser en vidrio o plástico, el diámetro no siempre es el mismo para todas las placas, pero la cubierta tiene un mayor diámetro para asegurar por encima y poder cerrar el recipiente ²¹⁰ . Se utilizó para la siembra, pases y aislamiento de las colonias bacterianas.	
Tubos de ensayo con tapa	Fabricados en vidrio con tapa negra con rosca ²¹¹ , utilizados para realizar siembra en medio líquido, realizar escala de Mc Farland y realizar recuento en placa.	

²⁰⁹ Tp-Laboratorio Químico. Matraz Erlenmeyer. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 20, Julio, 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/matraz-erlenmeyer.html>

²¹⁰ Tp-Laboratorio Químico. Placa de Petri. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 20 julio, 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/placa-de-petri.html>

²¹¹ DICORLAB. Tubo de ensayo en vidrio tapa rosca en teflón. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado el Jul, 2019]. Disponible en: <http://dicorlab.com/tubo-ensayo-vidrio-tapa-rosca-teflon/>

Cuadro 16. (Continuación)

Instrumento	Descripción	Ilustración
Micropipeta	La micropipeta es automática con volumen variable y alta precisión, completamente autoclavable. Utilizada para tomar cantidades de inóculo pequeñas y exacta	
Pipeta	Las pipetas están fabricadas en vidrio, se utilizan para transferir volúmenes menores a 20 ml de un recipiente a otro ²¹² , se utilizó en la investigación para pasar cantidad de inóculo exacto para cada medio líquido.	
Pipeteador	Aspiradores de pipetas, ayuda a evitar los riesgos con los líquidos tóxicos o corrosivos, se puede adaptar a cualquier tipo de pipeta, se rellena de una forma precisa girando la rueda hacia arriba ²¹³ .	

²¹² Tp-Laboratorio Químico. Pipeta. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado el Jul, 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/pipeta.html>

²¹³ France. Pipeteador. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado el Jul, 2019]. Disponible en: <http://www.labbrands.com/auxiliares-manuales-de-cremallera/631-pipeteador-de-cremallera-alla-france.html>

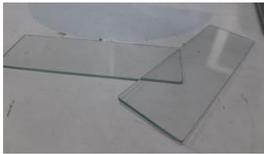
Cuadro 16. (Continuación)

Instrumento	Descripción	Ilustración
Jarra para anaerobiosis	Es un recipiente idóneo para realizar incubaciones en un ambiente de anaerobiosis, tiene soporte en acero inoxidable para instalar bolsas de generación de atmosfera libre de oxígeno ²¹⁴ , fue utilizada para realizar unas siembras iniciales de los microorganismos del ALU.	 A clear plastic jar with a red lid and a metal mesh support inside.
Asa bacteriológica	Fabricada de platino, acero, aluminio que termina en un arito de 5 mm o en punta. Se manipulo para aislamiento de colonias, para siembra en medio sólido y medio líquido.	 A blue plastic handle with a metal tip, packaged in a clear plastic bag.
Probeta graduada	Tubo fabricado en cristal o vidrio alargado y cerrado por la parte inferior, se utiliza para medir volumen de diferentes líquidos ²¹⁵ . Se utilizó para medir los volúmenes del LU, agua destilada para el medio y el mismo medio de cultivo.	 A graduated glass cylinder with blue markings and a white label.

²¹⁴ QUIOS, SAS. Jarra de anaerobiosis. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 20, julio, 2019]. Disponible en: <http://www.quios.com.co/producto/jarra-de-anaerobiosis/>

²¹⁵ TP.LABORATORIO QUÍMICO. Probeta. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 20 julio, 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/probeta-4.html>

Cuadro 16. (Continuación)

Instrumento	Descripción	Ilustración
Vidrio de reloj	El vidrio de reloj es una lámina de forma circular cóncava-convexa elaborada en vidrio ²¹⁶ . Se utilizó para medir con exactitud los reactivos para la realización de los medios de cultivos.	
Espátula de laboratorio	Es una lámina plana y angosta, con un mango hecho en plástico ²¹⁷ , utilizado para tomar las cantidades necesarias de los reactivos para el medio de cultivo, escala de Mc Farland y demás.	
Portaobjetos	Láminas de vidrio transparente de forma rectangular utilizadas para almacenar muestras, con el fin de poder observar en el microscopio ²¹⁸ , fueron utilizadas para la fijación de las muestras de las colonias sembradas en la tinción de Gram.	
Pipetas Pasteur	Son fabricadas en plástico y son desechables, fueron utilizadas para tomar gotas de reactivos que son utilizadas en la tinción de Gram.	

²¹⁶LABORATORIO CLÍNICO. Vidrio de Reloj. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 20, julio, 2019] . Disponible en: https://www.ecured.cu/Vidrio_de_Relaj

²¹⁷ TP-LABORATORIO QUÍMICO. Espátula. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 20, julio, 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/espatula-3.html>

²¹⁸TP-LABORATORIO QUÍMICO. Porta Objetos. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 20, julio, 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/portaobjetos.html>

Cuadro 16. (Continuación)

Instrumento	Descripción	Ilustración
Puntas	Puntas estériles desechables fabricadas en polipropileno, para micropipetas automáticas. Utilizadas para tomar volúmenes pequeños y exactos evitando que exista algún tipo de contaminación.	
Mechero de alcohol	Es un recipiente hecho en aluminio el cual contiene una mecha que al agregar alcohol o etanol y encenderlo permite generar una zona de asepsia, también utilizado para quemar el asa bacteriológica, fijar muestras en el portaobjetos y la boca de los tubos de ensayo con el fin de evitar contaminación con lo que se esté trabajando.	
Matraz aforado	Recipiente de vidrio con de fondo plano, tiene un cuello estrecho y alargado que tiene una marcación para indicar el volumen con exactitud y precisión ²¹⁹ . Estos fueron utilizados para la realización de la escala de Mc Farland con el fin de saber la concentración de microorganismos en determinado tiempo.	
Embudo de decantación	Es un recipiente de vidrio con forma de cono invertido y en la punta con presenta un desagüe, sirve para separar líquidos inmiscibles y no solubles ²²⁰ . Fue utilizado para separar la muestra del ALU y el medio inoculado en el desarrollo experimental el cual puso en contacto directo estos dos.	

²¹⁹TP-LABORATORIO QUÍMICO. Matraz de Aforo o Matraz Aforado. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 20, julio, 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/matraz-de-aforo-o-matraz-aforado.html>

²²⁰TP-LABORATORIO QUÍMICO. Embudo de Decantación o Balón de Decantación. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 20, julio, 2019]. Disponible en:

Cuadro 16. (Continuación)

Instrumento	Descripción	Ilustración
Termómetro de mercurio	Es un instrumento de vidrio que por dentro contiene mercurio el cual a medida que aumenta la temperatura se dilata y marca la temperatura a la cual está lo que se esté midiendo. Este se utilizó para la evaporación del agua en la muestra que fue puesta en contacto directo, para enviar a laboratorio.	
Placa dispersora de calor	La placa es fabricada en vitrocerámica, y puede llegar a soportar temperaturas superiores de 700 hasta 750°C. Utilizada para disipar de manera uniforme el calor generado por la plancha de calentamiento.	
Tubos tipo falcón	Los tubos tipo falcón son elaborados en polipropileno probados para resistir las centrifugaciones necesarias ²²¹ . Utilizados para centrifugar los microorganismos del medio líquido para obtención de mayor biomasa.	
Picnómetro	Es un instrumento de medición de vidrio que puede ser de diferentes volúmenes ²²² , utilizados para mediar la densidad del ALU antes del tratamiento y después del tratamiento.	

<https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/embudo-de-decantacion-o-balon-de-decantacion.html>

²²¹ FISHER SCIENTIFIC. Tubos cónicos para centrífuga Falcon. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 20, julio, 2019]. Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/falcon-15ml-conical-centrifuge-tubes-5/p-193301>

²²² LABORATORIO QUÍMICO. Picnómetro. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 20, julio, 2019]. Disponible en: <https://www.ecured.cu/Picn%C3%B3metro>

Cuadro 16. (Continuación)

Instrumento	Descripción	Ilustración
Vaso de precipitado	Vaso de vidrio de forma cilíndrica y fondo plano de diferentes capacidades ²²³ . Se utilizó para la adecuación de la muestra para enviar al laboratorio y para la medición de la viscosidad junto al viscosímetro.	
Frasco tapa rosca azul	Frasco de vidrio transparente o ámbar con rosca y tapa azul, diferentes capacidades y autoclavables ²²⁴ , utilizados para contener medio de cultivo, agua destilada y diferentes tipos de reactivos necesarios para el desarrollo de la investigación.	
Sobre de anaerobiosis	Los sobres de generación de anaerobiosis al ser puesto en las jarras de anaerobiosis absorben rápidamente en oxígeno que haya presente en ella, simultáneamente va generando dióxido de carbono ²²⁵ .	

²²³TP-LABORATORIO QUÍMICO. Vaso Precipitado. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado el 20, julio, 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/vaso-precipitado.html>

²²⁴BLAMIS. Frasco Tapa Rosca Azul. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado el 21, julio, 2019]. Disponible en: <https://www.blamis.com.co/product/frasco-tapa-rosca-azul>

²²⁵OXOID. Sistemas Generadores de Atmósfera. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 21, julio, 2019]. Disponible en: <http://www.analisisavanzados.com/index.php/anaerobiosis>

Cuadro 16. (Continuación)

Instrumento	Descripción	Ilustración
Gradilla	Es un utensilio utilizado para dar soporte a los tubos de ensayos o tubos de muestras ²²⁶ , fue utilizado para sostener y almacenar los tubos de todas las muestras.	

Fuente: elaboración propia.

²²⁶ TP-LABORATORIO QUÍMICO. Gradilla. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 21, julio, 2019]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/gradilla-3.html>

**ANEXO B.
EQUIPOS UTILIZADOS DURANTE LA EXPERIMENTACIÓN**

Cuadro 17. Equipos utilizados durante la experimentación.

Equipo	Descripción	Ilustración
Refrigerador	El refrigerador fue utilizado para guardar y mantener las muestras a una temperatura de 4 °C con el fin de inactivar el ciclo metabólico de los microorganismos en el desarrollo de la investigación.	
Autoclave	La autoclave es un equipo el cual permite la esterilización de materiales de laboratorio y reactivos, esta tiene la capacidad de tener ciclos rápidos, fácil sistema de control, monitoreo constante y mejorado y fáciles de mantener. Marca Tuttnauer, modelo 3850 EA. Cuenta con una cámara en acero inoxidable tipo 316, capacidad de 64 L y un filtro de aire 0.2 µm HEPA que garantiza aire estéril en cada ciclo ²²⁷ .	
Incubadora estándar	Se le llama incubadora estándar debido a su rango de operación que va desde 10 °C hasta 100 °C ²²⁸ , estas tienen la función de mantener condiciones de temperatura y oscuridad necesaria para el crecimiento de la población bacteriana. MARCA DiEs.	

²²⁷TUTTNAUER. Autoclaves automáticas y Semiautomáticas. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 21, julio, 2019]. Disponible en: https://tuttnauer.com/sites/default/files/tta-predegi-sp-autoclave-tuttnauer_0.pdf

²²⁸COMTITRONIC. Incubadoras línea Kryoven. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 21, julio, 2019]. Disponible en: <http://www.dies.com.co/wp-content/uploads/2017/12/Incubadoras-Kryoven.pdf>

Cuadro 17. (Continuación)

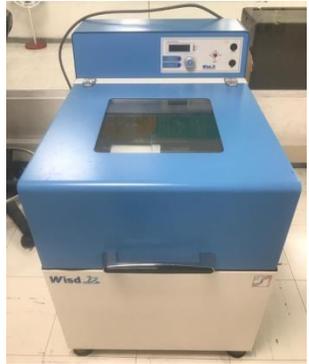
Equipo	Descripción	Ilustración
<p>Balanza analítica</p>	<p>La balanza analítica permite el pesaje óptimo y exacto de cantidades necesariamente estrictas tiene legibilidad de 0.0001g, hecho con puerta corrediza de vidrio para evitar interferencia de aire y plato de acero inoxidable, con calibración externa en el teclado²²⁹, marca Nimbus®</p>	
<p>Cabina de flujo laminar vertical</p>	<p>La cabina de flujo laminar ayudar a mantener un ambiente de asepsia dentro de esta para evitar cualquier tipo de contaminación. La cabina cuenta con una frecuencia de 60 Hz, voltaje de 110-130 y filtro HEPA con mini pliegues sin separadores, lámpara UV que ayuda a eliminar posibles microorganismos que pudieran quedar encima del área de trabajo²³⁰, marca ESCO</p>	
<p>Bactoincinera dor</p>	<p>Equipo que utilizado para esterilizar mediante calor e infrarrojo instrumentos de laboratorio la temperatura va de 50 °C hasta 825 °C, poder de 110 V / 50 Hz²³¹, en este caso asa bacteriológica que se utiliza para aislar, sembrar cultivos bacteriológicos, marca LABSCIENT, modelo HY800.</p>	

²²⁹AE ADAM. Balanzas Analíticas Nimbus. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 21, julio, 2019]. Disponible en: <https://www.adamequipment.com/es/balanzas-analiticas-nimbus>

²³⁰ESCO. Cabina Flujo laminar vertical Streamline - Esco. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 21, julio, 2019]. Disponible en: http://www.labbrands.com/vertical/975-cabina-flujo-laminar-vertical-streamline-esco.html#data_sheet

²³¹LAB SCIENT. Bactoincinera dor Resistencia A Temperatura: 825°C± 50°C. [Sitio WEB]. La entidad. [Consultado 21, julio, 2019]. Disponible en: <https://instrumentalia.com.co/laboratorio-quimico/349-bacto-incinerador-resistencia-a-temperatura-825-50.html>

Cuadro 17. (Continuación)

Equipo	Descripción	Ilustración
<p>Plancha de calentamiento con agitación magnética</p>	<p>La plancha de calor permite aumentar la temperatura gradualmente debido a su pantalla que es de fácil configuración además cuenta con agitación magnética lo cual permite que haya una mejor dispersión de calor en todas las muestras. Esta está fabricada con un plato de cerámica con recubrimiento en aluminio, velocidad de agitación y temperatura hasta 380 °C Y 1500 rpm respectivamente, Marca Daihan Scientific – WISD.</p>	
<p>Incubadora de agitación precisa</p>	<p>Este tipo de incubadoras proporcionan condiciones exactas de temperatura, y agitación durante el tratamiento biológico de los aceites usados. Marca Daihan Scientific - WISD, modelo thermostable IS-20R.</p>	
<p>Centrifuga</p>	<p>Equipo utilizado para separar contenidos de constituyen una sustancia mediante movimientos de rotación.</p>	
<p>Bomba de vacío</p>	<p>Fue 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 de que permite verificar la generación del vacío en el matraz de Erlenmeyer.</p>	

Cuadro 17. (Continuación)

Equipo	Descripción	Ilustración
Microscopio	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.	 A photograph of a white and blue binocular microscope, identified as a ZEISS Primo Star model. It features a large objective lens and a stage with a slide.
Viscosímetro	Utilizado para medir la viscosidad dinámica del aceite lubricante antes, durante y después del tratamiento. Contiene cuatro husillos diferentes que se utilizan para diferentes viscosidades	 A photograph of a digital viscosity meter. It has a silver base and a black display screen on top. Several green bottles of different sizes are visible in the background.
pHi metro	Utilizado para medir el pH de cualquier muestra consta de un instrumento de medición y un electrodo.	 A photograph of a digital pH meter. It is white with blue buttons and a digital display. A glass electrode is attached to the side. The brand name 'HANNA' is visible on the device.

Fuente: elaboración propia.

**ANEXO C.
REACTIVOS UTILIZADOS DURANTE LA EXPERIMENTACIÓN.**

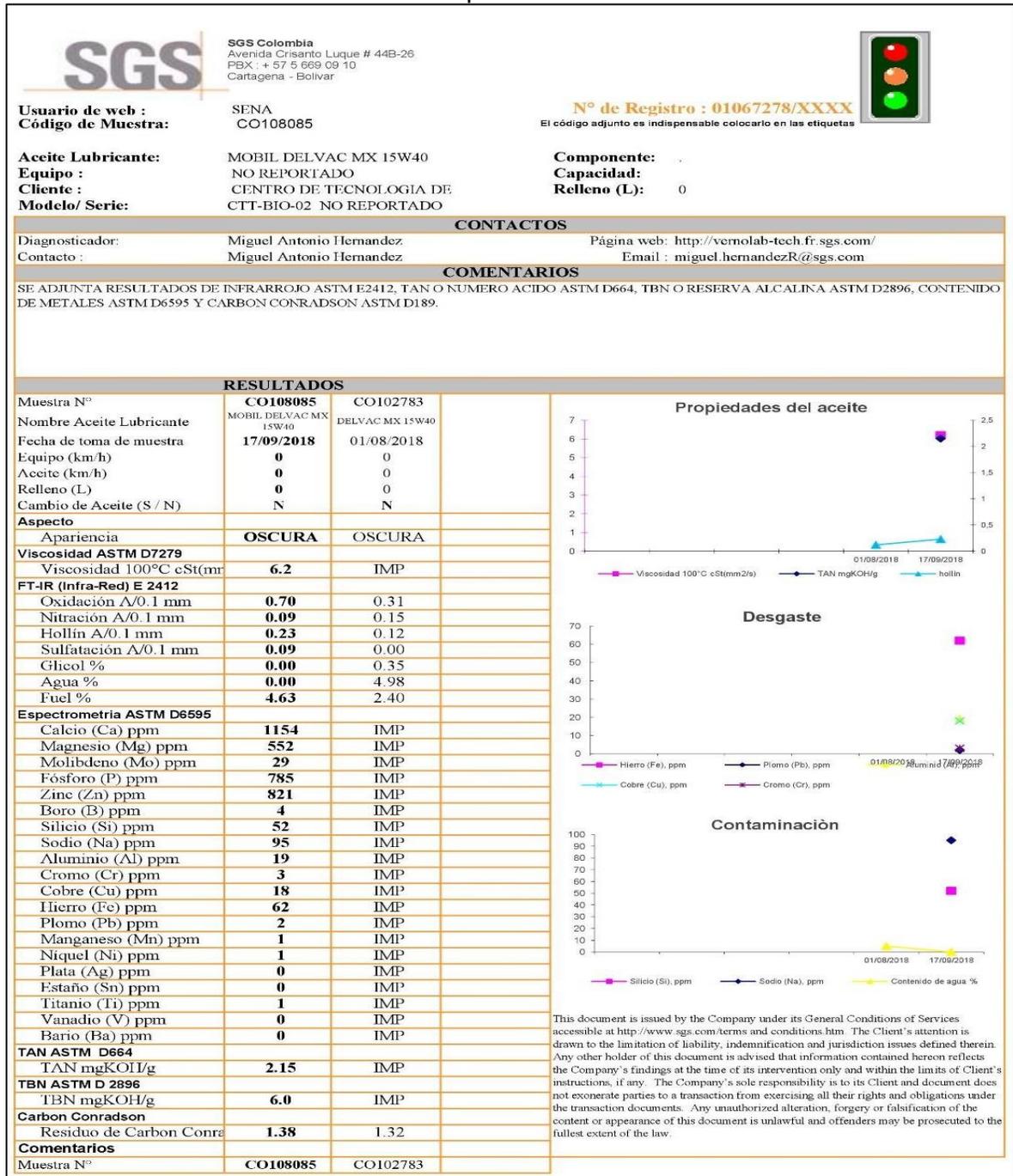
Cuadro 18. Reactivos utilizados durante la experimentación.

Reactivo	Descripción
Sulfato de Magnesio	Utilizada en la realización del medio de cultivo Bushnell Haas.
Cloruro de calcio	Utilizada en la realización del medio de cultivo Bushnell Haas.
Fosfato Mono-Potásico	Utilizada en la realización del medio de cultivo Bushnell Haas.
Fosfato Di-potásico	Utilizada en la realización del medio de cultivo Bushnell Haas.
Nitrato de Amonio	Utilizada en la realización del medio de cultivo Bushnell Haas.
Cloruro Férrico	Utilizada en la realización del medio de cultivo Bushnell Haas.
Agua destilada	Utilizada como disolvente en medio de cultivo líquidos y sólidos y en soluciones para la experimentación
Peptona	Utilizada para realizar diluciones
Agar- Agar (Granulado)	Solidifica el medio de cultivo
Caldo nutritivo	Medio de cultivo líquido
Agar nutritivo	Solidifica el medio con nutrientes
Agar granulado	Es el agente solidificante del medio de cultivo.
Glucosa	Utilizado como fuente de carbono para las cepas.
Cristal violeta	Colorante que es utilizado en la tinción de Gram.
Lugol de Gram	Fijador de microorganismos 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.
Cloruro de Bario	Escala de Mc Farland
Ácido Sulfúrico	Escala de Mc Farland
Aceite de inmersión	Aumentó la resolución del objetivo en el microscopio óptico.
Etanol 98% v/v	Utilizado para limpiar y mantener la asepsia del lugar del trabajo.
Hipoclorito de sodio 4.5% p/v	Utilizado para limpiador y esterilizar material de trabajo.

Fuente: elaboración propia

ANEXO D. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL ACEITE LUBRICANTE USADO DE MOTOR

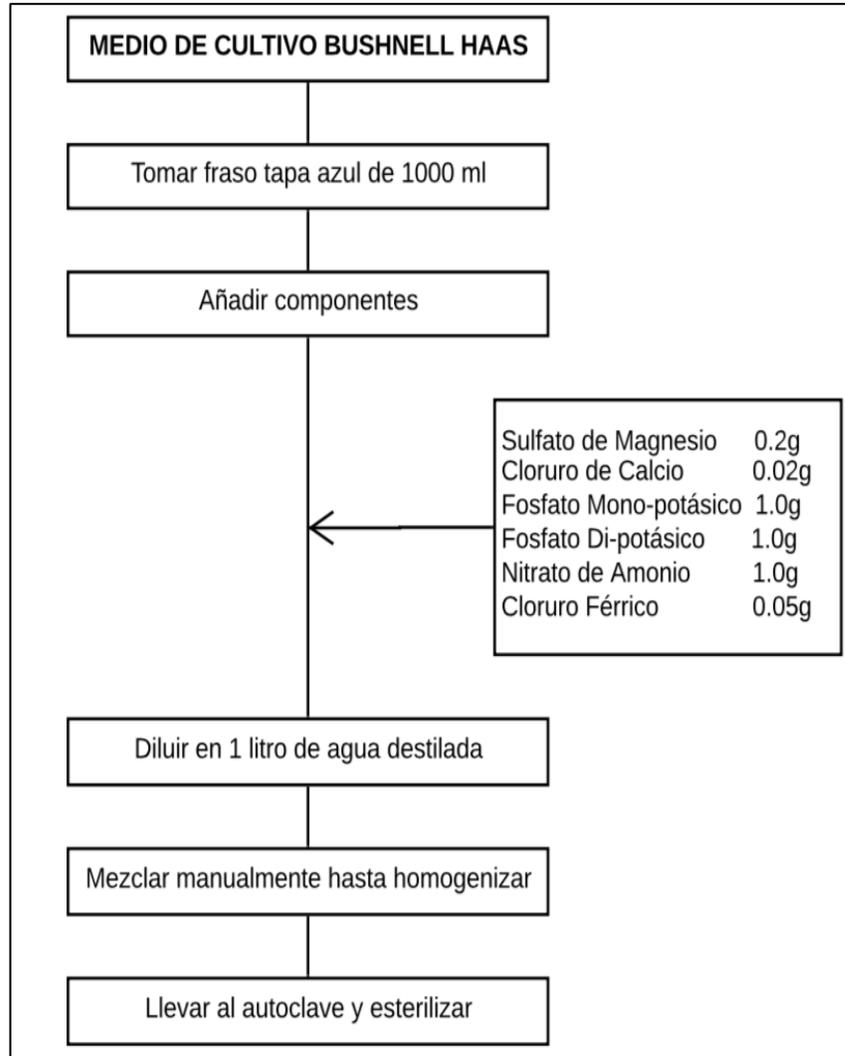
Ilustración 15. Caracterización fisicoquímica inicial.



ANEXO E.

PREPARACIÓN MEDIO DE CULTIVO BUSHNELL HAAS

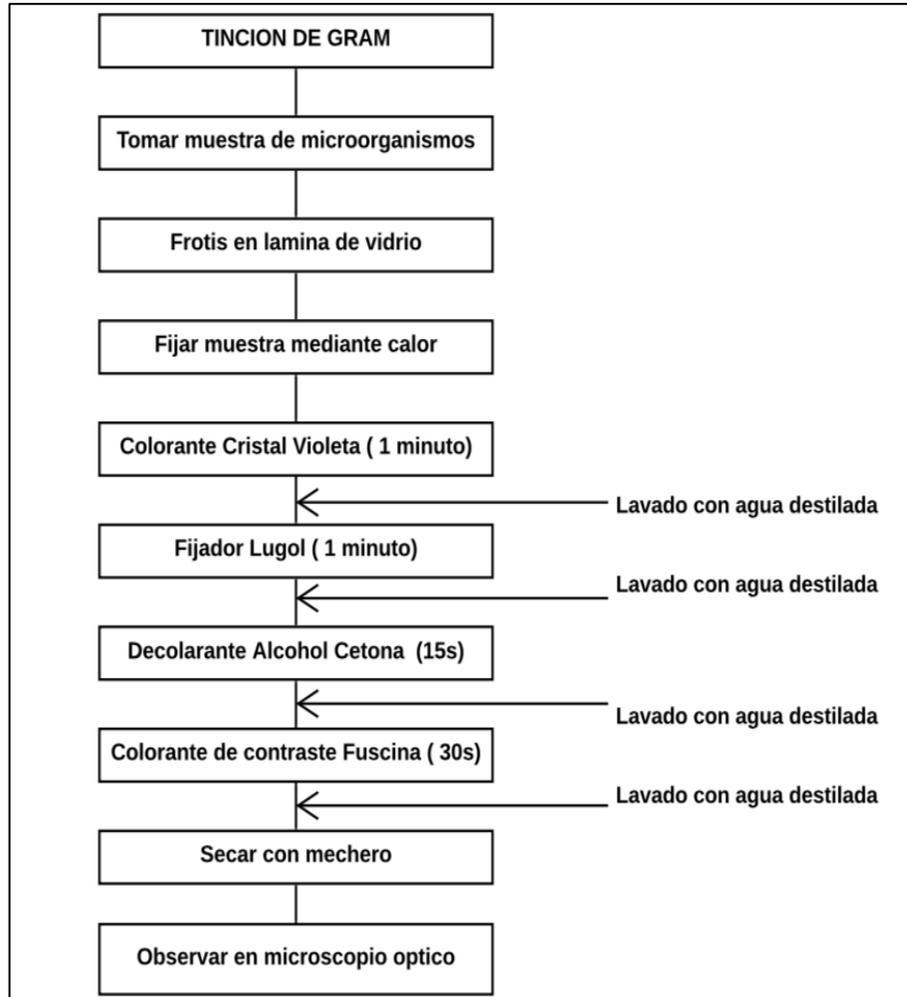
Ilustración 16. Medio de cultivo Bushnell Haas.



Fuente: elaboración propia.

ANEXO F.
PROCEDIMIENTO TINCIÓN DE GRAM

Ilustración 17. Tinción de Gram.



Fuente: elaboración propia.

**ANEXO G.
CARACTERIZACIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS Y HALÓGENOS
TOTALES DEL ACEITE LUBRICANTE USADO**

Ilustración 18. Caracterización inicial de Bifenilos policlorados y Halógenos Totales.

Analysis Certificate

Desde 1985 *Calidad controlada a través de análisis*



CALLE 15 N° 33-30, BARRIO PUENTE ARANDA
CODIGO POSTAL 111611, BOGOTÁ D.C., COLOMBIA

TEL: (+57) 1 745-6485
TEL: (+57) 5 671-0860

CEL: (350) 619 - 8084

PROJECT CLIENT:	SENA	ID TOL - REPORT:	2048
CONTACT ADDRESS:	dgonzalez@sena.edu.co	PURCHASE ORDER NO:	NE
TELEPHONE NUMBER:	317 3821515	RECEPTION DATE:	July 10, 2019
REQUESTED BY:	Ing Daniel Gonzales	REPORT DATE:	July 26, 2019

SAMPLE INFORMATION			
SAMPLING DATE:	NE	SAMPLE ID:	01
TYPE OF CONTAINER:	Plastic 500 mL	SAMPLE CODE:	CTT-(HBF)-01
GENERAL CONDITIONS:	Without any anomaly	QUANTITY:	100mL

1. PLAN AND METHOD OF SAMPLING NE
2. RECEIPT, INSPECTION AND STORAGE OF SAMPLE

SUMMARY	Photographic report
<p>The sample was received on July 10th and it was classified as apt for analysis due none anomaly was identified. The sample was not dehydrated due to it had a water content of 0.14%.</p>	



Quality Management System Certified to ISO 9001:2015, ISO 14001:2015 and ISO 18001:2007
These analyses, opinions or interpretations are based on material supplied by the client to whom, and for whose exclusive and confidential use this report is made. Results related only to the items tested. Texas OilTech Laboratories, L.P. and its officers assume no responsibility and make no warranty for proper operations of any petroleum, oil, gas or any other material in connection with which this report is used or relied on. This report may not be reproduced, except in full without prior written approval by Texas OilTech Laboratories, L.P.



Analysis Certificate

Desde 1985

CALLE 15 N° 33-30, BARRIO PUENTE ARANDA
CODIGO POSTAL: 111611, BOGOTA D.C., COLOMBIA



Calidad controlada através de análisis

TEL: (+57) 1 745-6485
TEL: (+57) 5 671-0860

CEL: (350) 619 - 8084

PROJECT CLIENT:	SENA	ID TOL - REPORT:	2048
CONTACT ADDRESS:	dagonzalez@sena.edu.co	PURCHASE ORDER NO:	NE
TELEPHONE NUMBER:	317 3821515	RECEPTION DATE:	July 10, 2019
REQUESTED BY:	Ing Daniel Gonzales	REPORT DATE:	July 24, 2019

3. TEST

RESULTS

<i>Parameter</i>	<i>Units</i>	<i>Result</i>
Chlorine (Total Halogens) in New and UsedB Oils, High Pressure Decomposition Device Method (HPDDM), ASTM D 808	ppm	598,5
Bifenilos Policlorados (PCBs) en Aceites Aislantes por Cromatografía de Gas ASTM D 4059	ppm	32,3

2



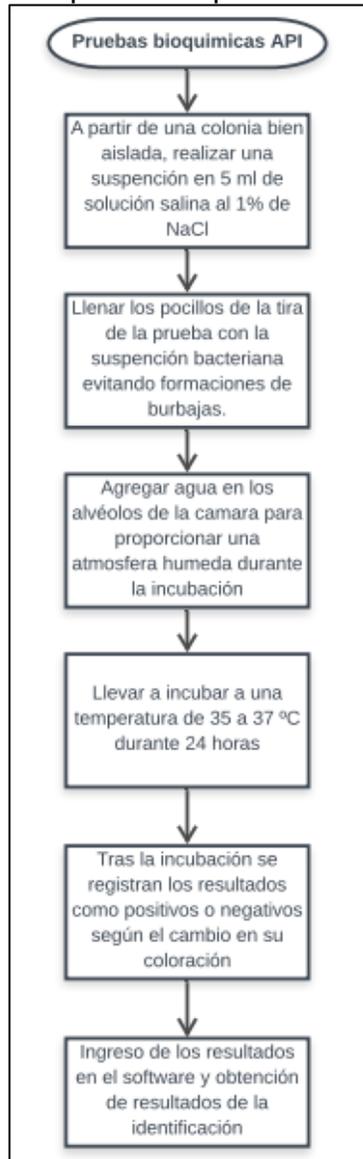
Quality Management System Certified to ISO 9001:2015, ISO 14001:2015 and ISO 18001:2007
These analyses, opinions or interpretations are based on material supplied by the client to whom, and for whose exclusive and confidential use this report is made. Results related only to the items tested. Texas OilTech Laboratories, L.P. and its officers assume no responsibility and make no warranty for proper operations of any petroleum, oil, gas or any other material in connection with which this report is used or relied on. This report may not be reproduced, except in full without prior written approval by Texas OilTech Laboratories, L.P.



Fuente: Oil Texas laboratorio.

ANEXO H. PRUEBAS BIOQUÍMICA API

Ilustración 19. Pruebas Bioquímicas api.



Fuente: elaboración propia.

ANEXO K. IDENTIFICACIÓN API DE LA CEPA C

Ilustración 22. Identificación api Cepa C.

Blomerieux - Bogota
APIWEB™

API 50 CHB V4.1

REFERENCIA FECHA
CEPA C 20/06/19

COMENTARIO
PROYECTO ACEITES SENA Y CTT

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 50 CHB V4.1
Perfil	-+.....++++.....++++.....++++.....++++.....++++.....+
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Bacillus circulans	98.5	0.67	MEL 92%	GLYG 92%	2KG 11%	

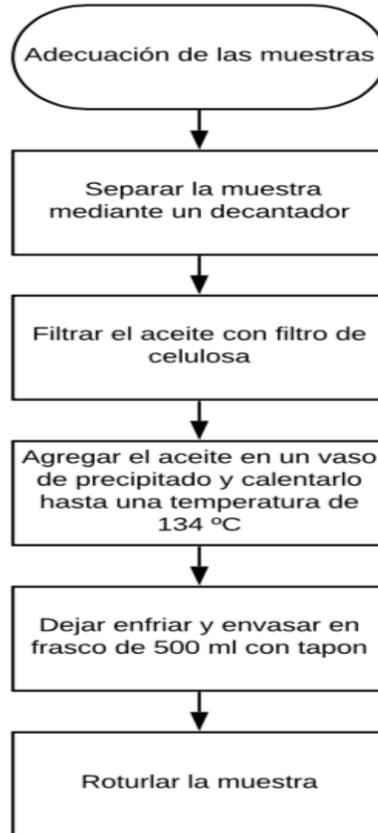
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Paenibacillus lautus	0.7	0.33	MEL 100%	GLYG 93%	2KG 0%	

Fuente: APIWEB™

ANEXO M.

ADECUACIÓN DE LAS MUESTRAS

Ilustración 24. Adecuación de las muestras.



Fuente: elaboración propia.

ANEXO N.

CARACTERIZACIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS Y HALÓGENOS TOTALES DEL ACEITE LUBRICANTE TRATADO EN UNA PROPORCIÓN DE 25% MEDIO / 75% ALU

Ilustración 25. Concentración final de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales para la alternativa 1 (25%MEDIO / 75% ALU)

Analysis Certificate

Desde 1985 *Calidad controlada através de análisis*

TEXAS OIL TECH Laboratories

CALLE 15 N° 33-30, BARRIO PUENTE ARANDA
CODIGO POSTAL 111611, BOGOTÁ D. C., COLOMBIA

TEL: (+57) 1 745-6485
TEL: (+57) 5 671-0860

CEL: (350) 619 - 8084

PROJECT CLIENT:	SENA	ID TOL - REPORT:	2048
CONTACT ADDRESS:	dagonzalez@sena.edu.co	PURCHASE ORDER NO:	NE
TELEPHONE NUMBER:	317 3821515	RECEPTION DATE:	July 10, 2019
REQUESTED BY:	Ing Daniel Gonzales	REPORT DATE:	July 26 ,2019

SAMPLE INFORMATION			
SAMPLING DATE:	NE	SAMPLE ID:	02
TYPE OF CONTAINER:	Plastic 500 mL	SAMPLE CODE:	CTT-(HBF)-02-1
GENERAL CONDITIONS:	Without any anomaly	QUANTITY:	200ml

1. **PLAN AND METHOD OF SAMPLING**
NE
2. **RECEIPT, INSPECTION AND STORAGE OF SAMPLE**

SUMMARY	Photographic report
<p>The samples were received on July 10th and it was classified as apt for analysis due none anomaly was identified. The samples were not dehydrated due to they had a water content of 0.08% and 0.02%.</p>	



Quality Management System Certified to ISO 9001:2015, ISO 14001:2015 and ISO 18001:2007
These analyses, opinions or interpretations are based on material supplied by the client to whom, and for whose exclusive and confidential use this report is made. Results related only to the items tested. Texas OilTech Laboratories, L.P. and its officers assume no responsibility and make no warranty for proper operations of any petroleum, oil, gas or any other material in connection with which this report is used or relied on. This report may not be reproduced, except in full without prior written approval by Texas OilTech Laboratories, L.P.



Analysis Certificate

Desde 1985

CALLE 15 N° 33-30, BARRIO PUENTE ARANDA
CODIGO POSTAL 111611, BOGOTA D.C., COLOMBIA



Calidad controlada a través de análisis

TEL: (+57) 1 745-6485
TEL: (+57) 5 671-0860

CEL: (350) 619 - 8084

PROJECT CLIENT:	SENA	ID TOL - REPORT:	2048
CONTACT ADDRESS:	dagonzalez@sena.edu.co	PURCHASE ORDER NO:	NE
TELEPHONE NUMBER:	317 3821515	RECEPTION DATE:	July 10, 2019
REQUESTED BY:	Ing Daniel Gonzales	REPORT DATE:	July 26, 2019

3. TEST

RESULTS

Parameter	Units	Result
Chlorine (Total Halogens) in New and Used B Oils, High Pressure Decomposition Device Method (HPDDM), ASTM D 808	ppm	496,4
Bifenilos Policlorados (PCBs) en Aceites Aislantes por Cromatografía de Gas ASTM D 4059	ppm	27,9

4



Quality Management System Certified to ISO 9001:2015, ISO 14001:2015 and ISO 18001:2007
These analyses, opinions or interpretations are based on material supplied by the client to whom, and for whose exclusive and confidential use this report is made. Results related only to the items tested. Texas OilTech Laboratories, L.P.
and its officers assume no responsibility and make no warranty for proper operations of any petroleum, oil, gas or any other material in connection with which this report is used or relied on. This report may not be reproduced, except in full without prior written approval by Texas OilTech Laboratories, L.P.



Fuente: Oil Texal laboratorio.

ANEXO O.

CARACTERIZACIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS Y HALÓGENOS TOTALES DEL ACEITE LUBRICANTE TRATADO EN UNA PROPORCIÓN DE 25% MEDIO / 75% ALU RÉPLICA

Ilustración 26. Concentración final de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales para la réplica de la alternativa 1 (25%MEDIO / 75% ALU).

Analysis Certificate

Desde 1985 *Calidad controlada a través de análisis*

CALLE 15 N° 33-30, BARRIO PUENTE ARANDA
CODIGO POSTAL 111611, BOGOTÁ D.C., COLOMBIA

TEL: (+57) 1 745-6485
TEL: (+57) 5 671-0860

CEL: (350) 619 - 8084



PROJECT CLIENT:	SENA	ID TOL - REPORT:	2048
CONTACT ADDRESS:	dagonzalez@sena.edu.co	PURCHASE ORDER NO:	NE
TELEPHONE NUMBER:	317 3821515	RECEPTION DATE:	July 10, 2019
REQUESTED BY:	Ing Daniel Gonzales	REPORT DATE:	July 26, 2019

SAMPLE INFORMATION

SAMPLING DATE:	NE	SAMPLE ID:	02
TYPE OF CONTAINER:	Plastic 500 mL	SAMPLE CODE:	CTT-(HBF)-02-2
GENERAL CONDITIONS:	Without any anomaly	QUANTITY:	200L

1. PLAN AND METHOD OF SAMPLING
NE
2. RECEIPT, INSPECTION AND STORAGE OF SAMPLE

SUMMARY	Photographic report
<p>The samples were received on July 10th and it was classified as apt for analysis due none anomaly was identified. The samples were not dehydrated due to they had a water content of 0.08% and 0.02%.</p>	



Analysis Certificate

Desde 1985

CALLE 15 N° 33-30, BARRIO PUENTE ARANDA
CODIGO POSTAL 111611, BOGOTÁ D.C., COLOMBIA



Calidad controlada a través de análisis

TEL: (+57) 1 745-6485
TEL: (+57) 5 671-0860

CEL: (350) 619 - 8084

PROJECT CLIENT:	SENA	ID TOL - REPORT:	2048
CONTACT ADDRESS:	dgonzalez@sena.edu.co	PURCHASE ORDER NO:	NE
TELEPHONE NUMBER:	317 3821515	RECEPTION DATE:	July 10, 2019
REQUESTED BY:	Ing Daniel Gonzales	REPORT DATE:	July 26, 2019

3. TEST

RESULTS

Parameter	Units	Result
Chlorine (Total Halogens) in New and UsedB Oils, High Pressure Decomposition Device Method (HPDDM), ASTM D 808	ppm	503,2
Bifenilos Policlorados (PCBs) en Aceites Aislantes por Cromatografía de Gas ASTM D 4059	ppm	23,2

6



Quality Management System Certified to ISO 9001:2015, ISO 14001:2015 and ISO 18001:2007
These analyses, opinions or interpretations are based on material supplied by the client to whom, and for whose exclusive and confidential use this report is made. Results related only to the items tested. Texas OilTech Laboratories, L.P. and its officers assume no responsibility and make no warranty for proper operations of any petroleum, oil, gas or any other material in connection with which this report is used or relied on. This report may not be reproduced, except in full without prior written approval by Texas OilTech Laboratories, L.P.



Fuente: Oil Texal laboratorio.

ANEXO P.

CARACTERIZACIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS Y HALÓGENOS TOTALES DEL ACEITE LUBRICANTE TRATADO EN UNA PROPORCIÓN DE 50% MEDIO / 50% ALU

Ilustración 27. Concentración final de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales para la alternativa 2 (50%MEDIO / 50% ALU).

Analysis Certificate		CALLE 15 N° 33-30, BARRIO PUENTE ARANDA CODIGO POSTAL 111611, BOGOTÁ D.C., COLOMBIA	
 <p style="font-size: x-small;">Desde 1985 <i>Calidad controlada a través de análisis</i></p>		TEL: (+57) 1 745-6485 TEL: (+57) 5 671-0860 CEL: (350) 619 - 8084	
PROJECT CLIENT:	SENA	ID TOL - REPORT:	2048
CONTACT ADDRESS:	dgonzalez@sena.edu.co	PURCHASE ORDER NO:	NE
TELEPHONE NUMBER:	317 3821515	RECEPTION DATE:	July 10, 2019
REQUESTED BY:	Ing Daniel Gonzales	REPORT DATE:	July 26 ,2019
SAMPLE INFORMATION			
SAMPLING DATE:	NE	SAMPLE ID:	03
TYPE OF CONTAINER:	Plastic 500 mL	SAMPLE CODE:	CTT-(HBF)-03-1
GENERAL CONDITIONS:	Without any anomaly	QUANTITY:	200mL
1. PLAN AND METHOD OF SAMPLING			
NE			
2. RECEIPT, INSPECTION AND STORAGE OF SAMPLE			
SUMMARY	Photographic report		
<p>The samples were received on July 10th and it was classified as apt for analysis due none anomaly was identified. The samples were dehydrated by Centrifugation getting a water content of 0.08% and 0.03%, respectively.</p>			



Quality Management System Certified to ISO 9001:2015, ISO 14001:2015 and ISO 18001:2007
 These analyses, opinions or interpretations are based on material supplied by the client to whom, and for whose exclusive and confidential use this report is made. Results related only to the items tested. Texas OilTech Laboratories, L.P. and its officers assume no responsibility and make no warranty for proper operations of any petroleum, oil, gas or any other material in connection with which this report is used or relied on. This report may not be reproduced, except in full without prior written approval by Texas OilTech Laboratories, L.P.



Analysis Certificate

Desde 1985

CALLE 15 N° 33-30, BARRIO PUENTE ARANDA
CODIGO POSTAL 111611, BOGOTÁ D.C., COLOMBIA



Calidad controlada a través de análisis

TEL: (+57) 1 745-6485
TEL: (+57) 5 671-0860

CEL: (350) 619 - 8084

PROJECT CLIENT:	SENA	ID TOL - REPORT:	2048
CONTACT ADDRESS:	da Gonzalez@sena.edu.co	PURCHASE ORDER NO:	NE
TELEPHONE NUMBER:	317 3821515	RECEPTION DATE:	July 10, 2019
REQUESTED BY:	Ing Daniel Gonzales	REPORT DATE:	July 26, 2019

3. TEST

RESULTS

Parameter	Units	Result
Chlorine (Total Halogens) in New and UsedB Oils, High Pressure Decomposition Device Method (HPDDM), ASTM D 808	ppm	19,9
Bifenilos Policlorados (PCBs) en Aceites Aislantes por Cromatografía de Gas ASTM D 4059	ppm	<5

8



Quality Management System Certified to ISO 9001:2015, ISO 14001:2015 and ISO 18001:2007
These analyses, opinions or interpretations are based on material supplied by the client to whom, and for whose exclusive and confidential use this report is made. Results related only to the items tested. Texas OilTech Laboratories, L.P. and its officers assume no responsibility and make no warranty for proper operations of any petroleum, oil, gas or any other material in connection with which this report is used or relied on. This report may not be reproduced, except in full without prior written approval by Texas OilTech Laboratories, L.P.



Fuente: Oil Texal laboratorio.

ANEXO Q.

CARACTERIZACIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS Y HALÓGENOS TOTALES DEL ACEITE LUBRICANTE TRATADO EN UNA PROPORCIÓN DE 50% MEDIO / 50% ALU RÉPLICA

Ilustración 28. Concentración final de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales para la réplica de la alternativa 2 (50%MEDIO / 50% ALU).

Desde 1985		Analysis Certificate		CALLE 15 N° 33-30, BARRIO PUENTE ARANDA CODIGO POSTAL 111611, BOGOTÁ D.C., COLOMBIA	
		<i>Calidad controlada através de análisis</i>		TEL: (+57) 1 745-6485 TEL: (+57) 5 671-0860 CEL: (350) 619 - 8084	
PROJECT CLIENT:	SENA	ID TOL - REPORT:		2048	
CONTACT ADDRESS:	dagonzalez@sena.edu.co	PURCHASE ORDER NO:		NE	
TELEPHONE NUMBER:	317 3821515	RECEPTION DATE:		July 10, 2019	
REQUESTED BY:	Ing Daniel Gonzales	REPORT DATE:		July 26 ,2019	
SAMPLE INFORMATION					
SAMPLING DATE:	NE	SAMPLE ID:		03	
TYPE OF CONTAINER:	Plastic 500 mL	SAMPLE CODE:		CTT-(HBF)-03-2	
GENERAL CONDITIONS:	Without any anomaly	QUANTITY:		200mL	
<ol style="list-style-type: none"> <u>PLAN AND METHOD OF SAMPLING</u> NE <u>RECEIPT, INSPECTION AND STORAGE OF SAMPLE</u> 					
SUMMARY			Photographic report		
<p>The samples were received on July 10th and it was classified as apt for analysis due none anomaly was identified. The samples were dehydrated by Centrifugation getting a water content of 0.08% and 0.03%, respectively.</p>					



Quality Management System Certified to ISO 9001:2015, ISO 14001:2015 and ISO 18001:2007
 These analyses, opinions or interpretations are based on material supplied by the client to whom, and for whose exclusive and confidential use this report is made. Results related only to the items tested. Texas OilTech Laboratories, L.P. and its officers assume no responsibility and make no warranty for proper operations of any petroleum, oil, gas or any other material in connection with which this report is used or relied on. This report may not be reproduced, except in full without prior written approval by Texas OilTech Laboratories, L.P.



Analysis Certificate

Desde 1985

CALLE 15 N° 33-30, BARRIO PUENTE ARANDA
CODIGO POSTAL 111611, BOGOTA D.C., COLOMBIA



Calidad controlada através de análisis

TEL: (+57) 1 745-6485
TEL: (+57) 5 671-0860
CEL: (350) 619 - 8084

PROJECT CLIENT:	SENA	ID TOL - REPORT:	2048
CONTACT ADDRESS:	daquonzaiz@sena.edu.co	PURCHASE ORDER NO:	NE
TELEPHONE NUMBER:	317 3821515	RECEPTION DATE:	July 10, 2019
REQUESTED BY:	Ing Daniel Gonzales	REPORT DATE:	July 26, 2019

3. TEST

RESULTS

Parameter	Units	Result
Chlorine (Total Halogens) in New and UsedB Oils, High Pressure Decomposition Device Method (HPDDM), ASTM D 808	ppm	27,3
Bifenilos Policlorados (PCBs) en Aceites Aislantes por Cromatografía de Gas ASTM D 4059	ppm	<5

10



Quality Management System Certified to ISO 9001:2015, ISO 14001:2015 and ISO 18001:2007
These analyses, opinions or interpretations are based on material supplied by the client to whom, and for whose exclusive and confidential use this report is made. Results related only to the items tested. Texas OilTech Laboratories, L.P. and its officers assume no responsibility and make no warranty for proper operations of any petroleum, oil, gas or any other material in connection with which this report is used or relied on. This report may not be reproduced, except in full without prior written approval by Texas OilTech Laboratories, L.P.



Fuente: Oil Texal laboratorio.

ANEXO R.

CARACTERIZACIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS Y HALÓGENOS TOTALES DEL ACEITE LUBRICANTE TRATADO EN UNA PROPORCIÓN DE 75% MEDIO / 25% ALU

Ilustración 29. Concentración final de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales para la alternativa 3 (75%MEDIO / 25% ALU).



Analysis Certificate

Desde 1985 *Calidad controlada a través de análisis*

CALLE 15 N° 33-30, BARRIO PUENTE ARANDA
CODIGO POSTAL 111611, BOGOTÁ D.C., COLOMBIA

TEL: (+57) 1 745-6485
TEL: (+57) 5 671-0860

CEL: (350) 619 - 8084

PROJECT CLIENT:	SENA	ID TOL - REPORT:	2048
CONTACT ADDRESS:	dagonzalez@sena.edu.co	PURCHASE ORDER NO:	NE
TELEPHONE NUMBER:	317 3821515	RECEPTION DATE:	July 10, 2019
REQUESTED BY:	Ing Daniel Gonzales	REPORT DATE:	July 26, 2019

SAMPLE INFORMATION			
SAMPLING DATE:	NE	SAMPLE ID:	04
TYPE OF CONTAINER:	Plastic 500 mL	SAMPLE CODE:	CTT-(HBF)-04-1
GENERAL CONDITIONS:	Without any anomaly	QUANTITY:	200mL

1. **PLAN AND METHOD OF SAMPLING**
NE

2. **RECEIPT, INSPECTION AND STORAGE OF SAMPLE**

SUMMARY	Photographic report
<p>The samples were received on July 10th and it was classified as apt for analysis due none anomaly was identified. The samples were not dehydrated due to they had a water content of 0.02% and 0.01%, respectively</p>	

11



Quality Management System Certified to ISO 9001:2015, ISO 14001:2015 and ISO 18001:2007
These analyses, opinions or interpretations are based on material supplied by the client to whom, and for whose exclusive and confidential use this report is made. Results related only to the items tested. Texas OilTech Laboratories, L.P. and its officers assume no responsibility and make no warranty for proper operations of any petroleum, oil, gas or any other material in connection with which this report is used or relied on. This report may not be reproduced, except in full without prior written approval by Texas OilTech Laboratories, L.P.



Analysis Certificate

Desde 1985

CALLE 15 N° 33-30, BARRIO PUENTE ARANDA
CODIGO POSTAL 111611, BOGOTA D.C., COLOMBIA



Calidad controlada a través de análisis

TEL: (+57) 1 745-6485
TEL: (+57) 5 671-0860
CEL: (350) 619 - 8084

PROJECT CLIENT:	SENA	ID TOL - REPORT:	2048
CONTACT ADDRESS:	da Gonzalez@sen.edu.co	PURCHASE ORDER NO:	NE
TELEPHONE NUMBER:	317 3821515	RECEPTION DATE:	July 10, 2019
REQUESTED BY:	Ing Daniel Gonzales	REPORT DATE:	July 26, 2019

3. TEST

RESULTS

Parameter	Units	Result
Chlorine (Total Halogens) in New and Used B Oils, High Pressure Decomposition Device Method (HPDDM), ASTM D 808	ppm	<5,0
Bifenilos Policlorados (PCBs) en Aceites Aislantes por Cromatografía de Gas ASTM D 4059	ppm	17,3



Quality Management System Certified to ISO 9001:2015, ISO 14001:2015 and ISO 18001:2007
These analyses, opinions or interpretations are based on material supplied by the client to whom, and for whose exclusive and confidential use this report is made. Results related only to the items tested. Texas OilTech Laboratories, L.P. and its officers assume no responsibility and make no warranty for proper operations of any petroleum, oil, gas or any other material in connection with which this report is used or relied on. This report may not be reproduced, except in full without prior written approval by Texas OilTech Laboratories, L.P.



12

Fuente: Oil Texal laboratorio.

ANEXO S.

CARACTERIZACIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS Y HALÓGENOS TOTALES DEL ACEITE LUBRICANTE TRATADO EN UNA PROPORCIÓN DE 75% MEDIO / 25% ALU RÉPLICA

Ilustración 30. Concentración final de Bifenilos Policlorados y Halógenos Totales para la réplica de la alternativa 3 (75%MEDIO / 25% ALU).

Analysis Certificate

Desde 1985 *Calidad controlada a través de análisis*



CALLE 15 N° 33-30, BARRIO PUENTE ARANDA
CODIGO POSTAL 111611, BOGOTÁ D.C., COLOMBIA

TEL: (+57) 1 745-6485
TEL: (+57) 5 671-0860

CEL: (350) 619 - 8084

PROJECT CLIENT:	SENA	ID TOL - REPORT:	2048
CONTACT ADDRESS:	dagonzalez@sena.edu.co	PURCHASE ORDER NO:	NE
TELEPHONE NUMBER:	317 3821515	RECEPTION DATE:	July 10, 2019
REQUESTED BY:	Ing Daniel Gonzales	REPORT DATE:	July 26, 2019

SAMPLE INFORMATION			
SAMPLING DATE:	NE	SAMPLE ID:	04
TYPE OF CONTAINER:	Plastic 500 mL	SAMPLE CODE:	CTT-(HBF)-04-2
GENERAL CONDITIONS:	Without any anomaly	QUANTITY:	200mL

1. **PLAN AND METHOD OF SAMPLING**
NE
2. **RECEIPT, INSPECTION AND STORAGE OF SAMPLE**

SUMMARY	Photographic report
<p>The samples were received on July 10th and it was classified as apt for analysis due none anomaly was identified. The samples were not dehydrated due to they had a water content of 0.02% and 0.01%, respectively</p>	

Analysis Certificate

Desde 1985

CALLE 15 N° 33-30, BARRIO PUENTE ARANDA
CODIGO POSTAL 111611, BOGOTA D.C., COLOMBIA



Calidad controlada através de análisis

TEL: (+57) 1 745-6485
TEL: (+57) 5 671-0860

CEL: (350) 619 - 8084

PROJECT CLIENT:	SENA	ID TOL - REPORT:	2048
CONTACT ADDRESS:	dagonzalez@sena.edu.co	PURCHASE ORDER NO:	NE
TELEPHONE NUMBER:	317 3821515	RECEPTION DATE:	July 10, 2019
REQUESTED BY:	Ing Daniel Gonzales	REPORT DATE:	July 24, 2019

3. TEST

RESULTS

Parameter	Units	Result
Chlorine (Total Halogens) in New and UsedB Oils, High Pressure Decomposition Device Method (HPDDM), ASTM D 808	ppm	<5,0
Bifenilos Policlorados (PCBs) en Aceites Aislantes por Cromatografía de Gas ASTM D 4059	ppm	14,6

1. **OBSERVATIONS:**

None

2. **Apply additions, modifications or exclusions of the method: YES NO Explain:**

No

Respectfully,
For Texas OilTech Laboratories, L.P.

Jair Silva H.
Laboratory Coordinator - Colombia

14



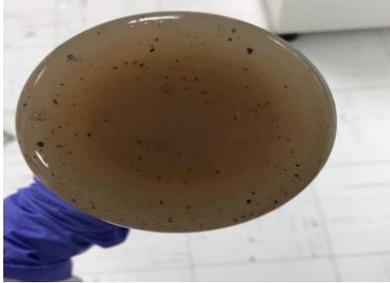
Quality Management System Certified to ISO 9001:2015, ISO 14001:2015 and ISO 18001:2007
These analyses, opinions or interpretations are based on material supplied by the client to whom, and for whose exclusive and confidential use this report is made. Results related only to the items tested. Texas OilTech Laboratories, L.P. and its officers assume no responsibility and make no warranty for proper operations of any petroleum, oil, gas or any other material in connection with which this report is used or relied on. This report may not be reproduced, except in full without prior written approval by Texas OilTech Laboratories, L.P.



Fuente: Oil Texal laboratorio.

ANEXO T.
EVIDENCIA EXPERIMENTACIÓN

Cuadro 19. Evidencia de la investigación.

Descripción	Imagen
Medio de cultivo Bushnell Haas	
Incubación de microorganismos	
Precipitado de inculo en el tratamiento del contacto directo	

Cuadro 19. (Continuación)

Descripción	Imagen
Pases de las bacterias	 A photograph showing approximately 15 petri dishes arranged on a white surface. Each dish contains a bacterial culture on a solid medium, showing varying degrees of growth and coloration, likely from a streak plate or pour plate technique.
Caldo nutritivo	 A photograph of two Erlenmeyer flasks on a laboratory bench. Both flasks contain a clear, yellowish liquid, which is the nutritive broth. In the background, other lab equipment like a bottle of alcohol and a pipette are visible.
Filtración del aceite lubricante usado	 A photograph of a laboratory setup for filtering used lubricating oil. It includes a vacuum flask, a filter funnel, and a motorized vacuum pump connected to a filtration apparatus.
Puesta en contacto entre el consorcio y el inóculo	 A photograph showing two Erlenmeyer flasks on a lab bench. The flask on the left contains a yellowish liquid, while the flask on the right contains a dark, opaque liquid. Both flasks are covered with a piece of brown paper, likely to prevent contamination or evaporation.

Cuadro 19. (Continuación)

Descripción	Imagen
Prueba bioquímica api para cepa D.	
Identificación api Cepa B.	
Puesta en contacto entre el inóculo y el aceite lubricante	
Pruebas bioquímicas api para cepas A y C	

Cuadro 19. (Continuación)

Descripción	Imagen
Cepas A, B, C, Y D y sus respectivo inóculos.	 A photograph showing a laboratory tray with eight petri dishes and four bottles of bacterial cultures. The petri dishes are arranged in two rows of four. The top row shows four dishes with varying degrees of bacterial growth, labeled 'Cepa A', 'Cepa B', 'Cepa C', and 'Cepa D'. The bottom row shows four dishes, some with more pronounced growth. The bottles are also labeled and contain yellowish liquids. The labels on the dishes and bottles include handwritten text such as 'Cepa A', 'Cepa B', 'Cepa C', 'Cepa D', and dates like '23-05-19'.
Muestras adecuadas del tratamiento	 A photograph showing a row of seven bottles of bacterial cultures on a white laboratory bench. The bottles are labeled with 'Original' and various percentages: '25%', '25%', '25%', '25%', '25%', '25%', and '25%'. The bottles contain liquids of different colors, ranging from clear to dark brown. The background shows a laboratory setting with a window and other equipment.

Fuente: elaboración propia.