

**ESTADO DEL ARTE EN LA APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS BIOTECNOLÓGICOS  
PARA LA DEGRADACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS GRASOS PROCEDENTES DE  
EFLUENTES METALMECÁNICOS**

**SUSAN NATALIA CATAÑO VALENCIA**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA  
AGROINDUSTRIAL  
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL  
MANIZALES  
2016**

**ESTADO DEL ARTE EN LA APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS BIOTECNOLÓGICOS  
PARA LA DEGRADACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS GRASOS PROCEDENTES DE  
EFLUENTES METALMECÁNICOS**

**SUSAN NATALIA CATAÑO VALENCIA**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:  
Magíster en Microbiología Agroindustrial**

**Director:**

**PhD. Javier Mauricio Naranjo Vasco**

**Codirector:**

**PhD. Wilmar Osorio Viana**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA  
AGROINDUSTRIAL  
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL  
MANIZALES  
2016**

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

---

---

**Firma de Director del Trabajo de Grado**

---

**Firma del Presidente del Comité de Programa**

---

**Firma de Evaluador**

## DEDICATORIA

*“La inteligencia consiste no solo en el conocimiento, sino también en la destreza de aplicar dichos conocimientos en la práctica”*

Aristóteles

Este trabajo se lo dedico a mis padres, tanto por haberme dado la inteligencia, como por enseñarme a utilizarla. Su constante apoyo y motivación para hacer crecer en mí el amor por el estudio, sentaron las bases para alcanzar este logro. Angélica y Daniel, mis queridos hermanitos, ustedes también han sido un gran incentivo en mi vida.

A Dios, infinitas gracias por haberme regalado una familia tan especial.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Instituciones y oficinas**

Universidad Católica de Manizales

- Rectoría, Vicerrectoría Académica y Vicerrectoría Administrativa y Financiera.
- Dirección de Investigaciones y Posgrados.
- Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial.

A las empresas INCOLMA INVERMEC y Soluciones Microbianas del Trópico por el apoyo técnico, asesorías y suministro de insumos, durante la parte experimental de este trabajo.

### **Doctores e investigadores**

- Dr. Mauricio Naranjo Vasco y Dr. Wilmar Osorio Viana, Directores de la tesis. Por la determinación con que asumieron este compromiso, la confianza, motivación y apoyo constantes durante el rescate de este barco que navegaba a la deriva.
- M.Sc. Patricia Eugenia Vélez e Ing. José Fernando Restrepo, por su paciencia, enseñanzas y acompañamiento durante una gran parte de esta aventura.
- M.Sc. Narmer Fernando Galeano, por su acompañamiento en la realización de las pruebas de laboratorio.
- M.Sc. Dora Janeth García Jaramillo, por siempre estar atenta y dispuesta a brindarme sus valiosas recomendaciones.

### **Estudiantes de Postgrados y Compañeros**

A Margarita María Uribe López, Guido Ernesto Villota Calvachi y Néstor Fabio Holguín Osorio, por todos los momentos compartidos y el apoyo constante en las duras jornadas de trabajo.

### **Agradecimientos personales**

A Santiago Herrera Castaño por su paciencia y compañía, además de tener las palabras perfectas para sacarme una sonrisa hasta en los momentos más difíciles.

A la Rectora de la Institución Educativa Hojas Anchas, Carmen Sofía Monroy Díaz, por la flexibilidad que me brindó en el horario de trabajo, para hacer posible mi crecimiento académico y profesional.

## CONTENIDO

1	ENFOQUE DE LA TESIS .....	14
1.1	Contexto.....	14
1.1.1	Normativa ambiental .....	14
1.2	Problema de investigación.....	15
1.3	Objetivos.....	17
1.3.1	Objetivo general .....	17
1.3.2	Objetivos específicos.....	17
1.4	Metodología .....	17
1.4.1	Metodología de revisión .....	17
1.4.2	Metodología experimental.....	18
1.5	Antecedentes .....	20
2	REFERENTE TEÓRICO.....	24
2.1	Generalidades del sector metalmecánico.....	24
2.1.1	Sector metalmecánico en Colombia.....	24
2.1.2	Sector metalmecánico en Manizales .....	26
2.1.3	Residuos generados en los procesos de la industria metalmecánica ....	28
2.1.4	Impacto ambiental de la industria metalmecánica.....	34
2.2	Tecnologías de tratamiento de residuos peligrosos.....	38
2.2.1	Tratamientos Físico-Químicos .....	39
2.2.2	Tratamientos Térmicos .....	41
2.2.3	Tratamientos Biológicos.....	41
2.3	Biorremediación .....	44
2.3.1	Reactores de Suelos Activados (RSA) .....	46
2.3.2	Compostaje .....	46
2.3.2.1	Fases del compostaje aerobio .....	47
2.3.2.1	Ventajas y desventajas del compostaje.....	49
2.3.3	Fitorremediación asistida por microorganismos.....	49
3	BIORREMEDIACIÓN DE RESIDUOS CONTAMINADOS CON GRASAS Y LUBRICANTES	
	51	

3.1	Estado del arte.....	51
3.2	Aspectos claves en la biorremediación de residuos contaminados con grasas y lubricantes.....	63
3.2.1	Características fisicoquímicas tenidas en cuenta a nivel experimental .	63
3.2.1.1	Aireación.....	63
3.2.1.2	pH.....	64
3.2.1.3	Temperatura.....	65
3.2.1.4	Relación Carbono/Nitrógeno/Fósforo (C/N/P).....	65
3.2.1.5	Humedad.....	65
3.2.2	Aislamiento de microorganismos.....	66
3.2.3	Microorganismos relevantes.....	66
3.2.3.1	<i>Pseudomonas sp.</i> .....	68
3.2.4	Evaluación de la degradación microbiana.....	76
3.2.4.1	Actividad deshidrogenasa.....	76
3.2.4.2	Respirometría.....	77
3.2.4.3	Actividad lipolítica.....	77
4	ASPECTOS TECNOLÓGICOS DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL PARA TRATAMIENTO POR BIORREMEDIACIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS CONTAMINADOS CON GRASAS Y LUBRICANTES.....	78
4.1	Metodología para la aplicación a nivel industrial.....	78
4.1.1	Sitio de muestreo y recolección de muestras.....	78
4.1.2	Composición de los residuos industriales.....	79
4.1.3	Aislamiento y purificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos	79
4.1.4	Caracterización e identificación microbiana.....	80
4.1.4.1	Caracterización fenotípica.....	80
4.1.4.2	Caracterización genotípica.....	80
4.1.5	Tolerancia y degradabilidad de grasas.....	81
4.1.6	Alternativas de aplicación industrial.....	82
4.1.6.1	Compostaje.....	82
4.1.6.2	Fermentación en estado sólido (SSF).....	82

4.1.6.3	Producción, extracción y purificación de lipasas por FSS .....	86
4.1.7	Selección del proceso e identificación de las variables de diseño.....	87
4.1.8	Diseño, análisis de sensibilidad y optimización de variables.....	88
4.1.9	Seguimiento del proceso en escala piloto .....	89
4.1.10	Caracterización de productos y evaluación económica .....	89
4.2	Caso de estudio: biodegradación por compostaje de un residuo sólido contaminado con grasas y aceites de una empresa metalmeccánica de la ciudad de Manizales .....	89
4.2.1	Sitio de muestreo y recolección de muestras.....	90
4.2.2	Caracterización fisicoquímica de los residuos industriales .....	90
4.2.3	Aislamiento y purificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos 91	
4.2.4	Caracterización fenotípica microbiana.....	91
4.2.5	Alternativa de aplicación industrial: Compostaje .....	92
4.2.6	Discusión de resultados .....	94
4.2.6.1	Caracterización fisicoquímica.....	94
4.2.6.2	Aislamiento y purificación de bacterias.....	94
4.2.6.3	Caracterización fenotípica .....	94
4.2.6.4	Compostaje.....	95
5	CONCLUSIONES.....	96
6	REFERENCIAS.....	98



## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ANDI: Asociación Nacional de Empresarios de Colombia

BID: Banco Internacional de Desarrollo

BHMS: Medio Selectivo de Sales Minerales Bushnell Hass

CBS: Caldo Básico de Sales

CCMPC: Cámara de Comercio de Manizales por Caldas

C/N: Relación carbono: nitrógeno

C/N/P: Relación carbono: nitrógeno: fósforo

COT: Carbono Orgánico Total

DANE: Departamento Administrativo Nacional de Estadística

DBO<sub>5</sub>: Demanda Biológica de Oxígeno

DQO: Demanda Química de Oxígeno

HTP: Hidrocarburos Totales del Petróleo

ICER: Informe de Coyuntura Económica Regional

IDEAM: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales

ILAFA: Instituto Latinoamericano del Fierro y del Acero

PIB: Producto Interno Bruto

PHA: Hidrocarburos policíclicos aromáticos

RSA: Reactores de suelos activados

SSF: Fermentación en estado sólido

TIC: Tecnologías de la Información y la Comunicación y Competitividad

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Facturación anual y generación de empleos, por parte de la industria metalmeccánica.	.....27
<b>Tabla 2.2.</b> Operaciones que pueden llevarse a cabo en cada etapa del proceso de transformación en una empresa metalmeccánica.	.....30
<b>Tabla 2.3.</b> Principales impactos ambientales de las aguas residuales del sector metalmeccánico.	.....35
<b>Tabla 2.4.</b> Principales impactos de los residuos peligrosos del sector metalmeccánico.	.....36
<b>Tabla 2.5.</b> Tipificación de residuos obtenidos de la industria metalmeccánica en el departamento de Caldas.	.....37
<b>Tabla 2.6.</b> Tratamientos físico-químicos aplicados a residuos peligrosos.	.....39
<b>Tabla 2.7.</b> Tratamientos térmicos aplicados a residuos peligrosos.	.....41
<b>Tabla 2.8.</b> Tratamientos biológicos aplicados a residuos peligrosos.	.....42
<b>Tabla 2.9.</b> Ventajas y desventajas de los tipos de tratamiento aplicados sobre los residuos peligrosos.	.....43
<b>Tabla 2.10.</b> Parámetros iniciales para el compostaje de la mezcla de materiales contaminados por compuestos orgánicos.	.....47
<b>Tabla 2.11.</b> Ventajas y desventajas del compostaje como técnica de biorremediación.	.....49
<b>Tabla 2.12.</b> Resumen de las técnicas de fitorremediación.	.....49
<b>Tabla 3.1.</b> Comparación de los estudios experimentales realizados sobre biorremediación de suelos contaminados con grasas y aceites.	.....55
<b>Tabla 3.2.</b> Características generales del cromosoma de	.....70

*P.aeruginosa*.

**Tabla 3.3.** Codificación de las enzimas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* que participan en la  $\beta$ - Oxidación de los ácidos grasos. ....73

**Tabla 4.1.** Caracterización fenotípica de las colonias obtenidas del residuo sólido graso. ....92

**Tabla 4.2.** Registro de temperatura para las pilas de residuo graso. ....93

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Metodología de revisión.	.....18
<b>Figura 1.2</b> Diagrama de flujo para la implementación de un tratamiento de biorremediación de residuos sólidos contaminados con grasas y lubricantes.	.....19
<b>Figura 1.3</b> Certificación ambiental en la cadena metalmeccánica.	.....23
<b>Figura 2.1</b> Descripción del sector metalmeccánico.	.....25
<b>Figura 2.2.</b> Certificaciones con las que cuentan las empresas del sector.	.....28
<b>Figura 2.3.</b> Etapas básicas de proceso en las empresas metalmeccánicas.	.....29
<b>Figura 2.4.</b> Proceso de producción de machetes y corrientes de residuos peligrosos generados.	.....33
<b>Figura 2.5.</b> Estrategias de biorremediación.	.....45
<b>Figura 2.6.</b> Etapas del proceso de compostaje en función de la temperatura.	.....48
<b>Figura 3.1.</b> Artículos publicados desde 1997 sobre biorremediación/biodegradación en revistas de investigación científica internacionales referenciados en las bases de datos Science Direct, Springer y Web of Science.	.....51
<b>Figura 3.2.</b> Artículos sobre biorremediación/biodegradación de suelos contaminados con aceites y lubricantes industriales referenciados en la base de datos Science Direct.	.....52
<b>Figura 3.3.</b> Ruta básica de degradación microbiana aerobia de los hidrocarburos.	.....64
<b>Figura 3.4.</b> Transferencia de masa de micelas a la célula bacteriana.	.....68

<b>Figura 3.5.</b> Árbol filogenético de máxima similitud de género <i>Pseudomonas</i> basado en la secuencia del gen 16S rRNA.	.....69
<b>Figura 3.6.</b> Mapa del cromosoma circular de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> N002.	.....71
<b>Figura 3.7.</b> Rutas de degradación microbiana de n-alcanos.	.....72
<b>Figura 3.8.</b> Oxidación de n-alcanos por alcano hidroxilasas pertenecientes a la familia AlkB.	.....73
<b>Figura 3.9.</b> Enzimas producidas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> que participan en la degradación de los ácidos grasos.	.....74
<b>Figura 3.10.</b> Representación esquemática del regulón AlgR de <i>P. aeruginosa</i> .	.....75
<b>Figura 4.1.</b> Etapas de la identificación genotípica.	.....81
<b>Figura 4.2.</b> Reactor de bandejas.	.....84
<b>Figura 4.3.</b> Biorreactor de lecho empacado.	.....85
<b>Figura 4.4.</b> Tambor giratorio discontinuo.	.....85
<b>Figura 4.5.</b> Esquema de un biorreactor de lecho empacado con mezcla intermitente y aireación forzada.	.....86
<b>Figura 4.6.</b> Diagrama de flujo para el tratamiento por fermentación en estado sólido.	.....88
<b>Figura 4.7.</b> Residuo sólido de pulido contaminado con grasa animal y aceite lubricante mineral.	.....90
<b>Figura 4.8.</b> Dilución $1 \times 10^{-6}$ en Agar Tributirina de la muestra de residuo sólido graso.	.....91
<b>Figura 4.9.</b> Temperatura mostrada durante el compostaje para la pila evaluada.	.....93

# 1 ENFOQUE DE LA TESIS

## 1.1 Contexto

Manizales, capital de Caldas, es una ciudad del centro occidente de Colombia, ubicada en la Cordillera Central, con gran actividad económica, industrial, cultural y turística. Según los resultados y proyecciones (2005-2020) del censo realizado por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE, 2005), tiene una población de 396.075 habitantes, y debido a la crisis del café (su tradicional motor económico), a finales del siglo pasado inició una transformación en su vocación productiva, enfocándose en el sector industrial como su posible fuente de mayor desarrollo económico y social (Plan de Desarrollo de Manizales 2012 – 2015 “Gobierno en la calle”, citado por BID & Findeter, 2015).

Por sus fortalezas en competitividad, innovación, emprendimiento, sus recursos naturales y la calidad y talento humano de su gente, Manizales tiene las condiciones para ser una ciudad sostenible. De acuerdo al estudio de Ciudades Sostenibles desarrollado por el Banco Internacional de Desarrollo (BID) & Findeter (2015), se identificaron las áreas prioritarias para permitirle a la ciudad de Manizales mejorar las perspectivas de sostenibilidad y competitividad, entre las que se identificó como oportunidad de mejora la promoción del aprovechamiento integral de residuos<sup>1</sup>, ya que en la actualidad presenta los niveles más bajos en la separación y clasificación de residuos como parte de procesos de reciclado, en comparación con las otras ciudades de Colombia donde se ha realizado el estudio de Ciudades Sostenibles (Barranquilla, Bucaramanga y Pereira), así como la necesidad de implementar tratamientos de residuos industriales más amigables con el medio ambiente.

### 1.1.1 Normativa ambiental

El marco ambiental que avala la significancia de la presente revisión teórica, está fundamentada en el Decreto-Ley 2811 de 1974, en el cual se reglamenta el Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente cuyo objeto es “lograr la preservación y restauración del ambiente, prevenir y controlar los efectos nocivos de la explotación de los recursos naturales no renovables sobre los demás recursos, y regular la conducta humana, individual o colectiva, respecto de tales recursos y del ambiente”.

---

<sup>1</sup> Gestión, valorización, tratamiento y disposición final de los residuos generados.

A partir de este Código Nacional (artículos 34 al 38), la Ley 9° de 1979 o Código Sanitario Nacional, en cuyos artículos 22 a 35 se dictan disposiciones sobre los residuos sólidos, y teniendo en cuenta los compromisos adquiridos con la aprobación en 1989 y entrada en vigor el 5 de mayo de 1992, del Convenio de Basilea, sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación; tomando consciencia de que es preciso desarrollar y aplicar tecnologías ambientalmente racionales que generen pocos desechos, se estableció el Decreto 4741 de 2005 por el cual se reglamenta la prevención y el manejo de los residuos o desechos peligrosos generados en el marco de la gestión integral, con el fin de proteger la salud humana y el ambiente.

En la actualidad, este decreto conforma el Título 6 del Decreto 1076 de 2015, el cual es producto de la compilación con otras normas reglamentarias preexistentes respecto al manejo ambiental, ante la necesidad de racionalizar y simplificar el ordenamiento jurídico sobre el tema, y cuya sección 3 establece las obligaciones y responsabilidades del generador de residuos peligrosos, a partir de la cual se fundamenta el objetivo del presente trabajo.

## **1.2 Problema de investigación**

Manizales como ciudad en camino de fortalecer su industria debe aprovechar sus fortalezas, para mejorar las condiciones de vida bajo una premisa de sostenibilidad ambiental (BID & Findeter, 2015); es por esto que se hace necesario que desde la academia se promuevan proyectos de investigación donde se apliquen valores tanto éticos y económicos, como de sensibilización y responsabilidad hacia el entorno (Álvarez, 2013; ICFES, 1991; Novo, 2009). Dichos proyectos deben apuntar especialmente a la optimización de los procesos de producción industrial donde continuamente se generan corrientes indeseadas (corrientes de desecho) y sobre las cuales, por la legislación vigente, las empresas tienen la responsabilidad y obligación de disminuir su volumen, so pena de recibir sanciones económicas o restricciones en su operación (Decreto 1076 de 2015).

El sector metalmeccánico es reconocido como uno de los ejes principales de industrialización de Manizales (Cámara de Comercio de Manizales por Caldas (CCMPC) & Alcaldía de Manizales, 2014) y es un punto neurálgico que debe ser tenido en cuenta a nivel ambiental por la gran fuente de contaminación que representa, al generar residuos impregnados con aceites lubricantes y químicos industriales en las diferentes etapas de transformación de las piezas metálicas. Aunque dichos residuos, de acuerdo con el Título 6 del Decreto 1076 de 2015 son considerados peligrosos, muchas veces, son descargados directamente al suelo o las fuentes hídricas, o son incinerados, generando emisiones gaseosas tóxicas; ya

que se muestran recalcitrantes frente a los tratamientos fisicoquímicos de degradación convencionales (IDEAM, 2011; IQA, 2014).

Ante este panorama de alto riesgo ambiental, se hace evidente la necesidad de establecer sistemas de tipo biotecnológico para la mitigación y degradación de residuos, que permitan utilizar el potencial metabólico de los microorganismos para mineralizar los contaminantes (Sánchez & Rodríguez, 2003). Estos sistemas presentan ventajas económicas y ambientales sobre los métodos convencionales de tratamiento, especialmente los térmicos, tanto por la disminución en volumen y gastos de disposición de los residuos, como por la prevención de sanciones debidas al incumplimiento de la legislación (Sánchez & Rodríguez, 2003). En consecuencia, se originan las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Cuál es la importancia real de la industria metalmecánica en la ciudad de Manizales, y cuál es el impacto ambiental que ésta genera?
- ¿Qué está haciendo la industria metalmecánica para mitigar el impacto negativo de sus residuos sobre el ambiente?
- ¿Cuáles tratamientos de biorremediación muestran potencialidad de uso sobre los residuos recalcitrantes de la industria metalmecánica?
- ¿Qué condiciones y especificaciones deben tenerse en cuenta para aplicar un tratamiento de biorremediación a un residuo graso de la industria metalmecánica?

Para dar respuesta a estas preguntas se plantea la necesidad de investigar el estado del arte en el tema de biorremediación sobre residuos grasos, realizando una revisión integral de las características y particularidades que deben tenerse en cuenta para establecer sistemas de biodegradación que permitan utilizar el potencial metabólico de los microorganismos para transformar los contaminantes provenientes de la industria metalmecánica en compuestos más simples, poco o nada contaminantes (González, 2011; Sánchez & Rodríguez, 2003). Adicionalmente, se plantea la ejecución de algunas pruebas experimentales que permiten enriquecer el presente trabajo y adquirir mayor conocimiento de los procesos referenciados.



## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo general**

Evaluar a través de un estudio del estado del arte, las potencialidades de aplicación de tratamientos biotecnológicos en la degradación de residuos grasos procedentes de efluentes industriales metalmecánicos en la ciudad de Manizales.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

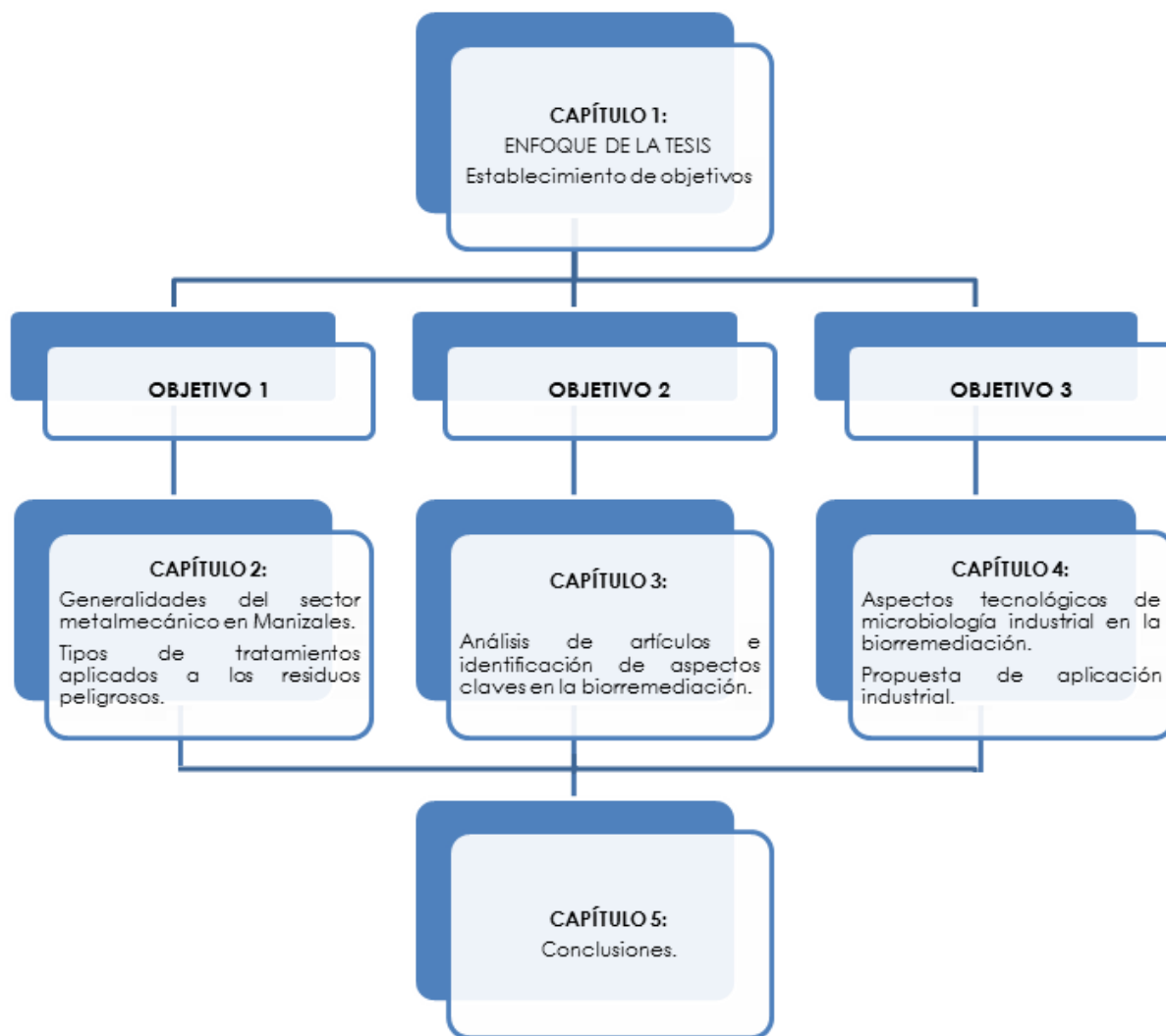
1. Establecer la importancia del sector industrial metalmecánico y su impacto ambiental en la ciudad de Manizales.
2. Analizar el estado del arte sobre el uso de la biorremediación como tratamiento de efluentes metalmecánicos contaminados con grasas y lubricantes.
3. Proponer, basado en el estado del arte, un protocolo para la implementación a nivel industrial de un tratamiento de biorremediación en efluentes metalmecánicos contaminados con grasas y lubricantes.

## **1.4 Metodología**

### **1.4.1 Metodología de revisión**

La presente revisión de tema consta de un capítulo introductorio y de contextualización del problema de investigación, tres capítulos correspondientes al cuerpo del trabajo, los cuales dan cumplimiento a los objetivos específicos planteados, y uno de conclusiones. En la Figura 1.1, se describe el esquema general de la información clave para construir el documento.

La fuente central de información fueron los artículos publicados en revistas de la base de datos Science Direct, complementada con artículos publicados en Redalyc, Springer y Scielo. Esta búsqueda se limitó a artículos del año 2000 en adelante, con preferencia por las publicaciones de la última década, relacionados principalmente con las palabras clave "Biorremediación" y/o "Biodegradación de Hidrocarburos".



**Figura 1.1.** Esquema general de la información clave para desarrollar la monografía.

### 1.4.2 Metodología experimental

Aunque el presente trabajo corresponde a una revisión de tema, en el capítulo 4 se integran los aspectos teóricos y tecnológicos analizados y se propone la metodología que se resume en la Figura 1.2 para implementar un tratamiento de biorremediación a nivel industrial. Esta metodología se describe con detalle en la sección 4.1 y respalda algunas pruebas experimentales que se realizaron durante un ejercicio de investigación complementario cuyos resultados se presentan en la sección 4.2.

Fuente: elaboración propia.



**Figura 1.2.** Diagrama de flujo para la implementación de un tratamiento de biorremediación de residuos sólidos contaminados con grasas y lubricantes.

## 1.5 Antecedentes

Aunque se conocen diversos tratamientos fisicoquímicos y biológicos para reducir el volumen y la toxicidad de los residuos peligrosos, son pocas las propuestas que se encuentran en la bibliografía sobre el manejo integrado y tratamiento de estos materiales en la industria metalmeccánica. A continuación se citan algunos de los trabajos que se han desarrollado sobre el tema a nivel internacional:

Flores et al., (2006), destacaron la importancia de la industria metalmeccánica en México, así como la necesidad de encontrar alternativas de uso a las toneladas de residuos peligrosos y no peligrosos generados en dicha actividad. Este trabajo se centró en la evaluación de la factibilidad de utilizar las virutas de hierro provenientes de las operaciones de esmerilado y barrenado, que generalmente quedan impregnadas con aceite, como medio reactivo para transformar Cr (VI) en efluentes contaminados, que además pueden contener carbonatos, sulfuros, cloruros y compuestos orgánicos.

Ferrer & Martínez (2007), realizaron un sondeo sobre el compromiso frente a la sostenibilidad ambiental de las diecisiete empresas metalmeccánicas oferentes de servicios petroleros, ubicadas en la costa oriental del Lago de la Región Zuliana (Venezuela), aplicando un instrumento evaluativo, en el cual indagaron si la misión, objetivos y la política empresarial contemplaban aspectos medioambientales, encontrando una tendencia hacia un posicionamiento ecológicamente responsable. Pero, aunque existe un nivel de conciencia y aceptación de algunos indicadores, realmente no se evidenciaron acciones claras que permitan avanzar en el cumplimiento de las metas.

Candian et al., (2015), presentaron una revisión actualizada de las rutas de recuperación de materias primas presentes en la gran variedad y volumen de residuos sólidos generados en la industria del acero (escorias, lodos, cascarillas de laminación, polvos y lodos de precipitación), que se caracterizan, en general, por la gran cantidad de metal presente en su composición; enfatizando en la importancia del desarrollo sostenible y la responsabilidad en el consumo de los recursos naturales.

Severo et al., (2015), realizaron un estudio por medio de encuestas para analizar la relación entre los conceptos de producción más limpia, sostenibilidad ambiental y el desempeño organizacional en 298 empresas del Cluster Automotriz metalmeccánico de la Serra Gaúcha, el cual es actualmente el segundo más grande de su tipo en Brasil. Los resultados mostraron que las empresas de Serra Gaúcha tienden a buscar procesos alternativos para reducir los costos y que las prácticas de producción limpia

contribuyen a aumentar la capacidad de producción y a mejorar aspectos de salud y seguridad.

Otros autores han realizado estudios sobre biorremediación de suelos contaminados con grasas y aceites, tales como Menéndez-Vega et al., (2007) que analizaron los efectos de la bioestimulación *in situ* sobre un subsuelo contaminado con hidrocarburos, proveniente de una antigua planta metalmeccánica del Norte de España. Y Lladó et al., (2012) que compararon la atenuación natural, la bioestimulación y la bioaumentación en un suelo contaminado con aceite de corte, tomados de una ex fábrica de tornillos en la ciudad de Barcelona (España), que fue abandonada en 1990. Estos y otros estudios experimentales de biorremediación realizados sobre residuos de composición similar a los de la industria metalmeccánica, aunque no necesariamente de este sector, se analizarán con más profundidad en el capítulo 3.

A nivel nacional, son mucho más escasos los estudios específicos para la industria metalmeccánica. Entre estos se encuentran:

Acero (2008) en su trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Ambiental y Sanitario, elaboró el plan de gestión integral de residuos peligrosos de la fábrica Santa Bárbara de la Industria Militar "Indumil", ubicada en la ciudad de Sogamoso (Boyacá), el cual incluyó la capacitación a los trabajadores sobre la manipulación de los residuos, el diseño de un centro de acopio bajo las especificaciones técnicas requeridas, un plan de contingencia para atender accidentes, y el seguimiento continuo. Los residuos allí generados, son producto de procesos metalmeccánicos tanto en fundición convencional como en microfundición para la producción de granadas de mano y de morteros, además de piezas metálicas para armamento, que según su caracterización, el 46 % son tóxicos, el 23% son altamente explosivos e inflamables y el 8% son corrosivos. Con la implementación de este plan, se mejoró su manejo en las diferentes etapas de la gestión, tales como: la recolección, transporte, embalaje, etiquetado, almacenamiento, tratamiento o disposición final, reduciendo en gran parte los riesgos ambientales y de salud ocupacional generados por éstos.

Cano & Cano (2008), presentaron el informe sobre el mejoramiento en el manejo de los residuos sólidos de la empresa Metálicas Caldas Ltda., luego de la implementación del plan de gestión integral de residuos sólidos, el cual consiste en separación en la fuente, recolección, almacenamiento, tratamiento y disposición final. En dicho informe, no se especifica la información sobre los tratamientos realizados y se da a entender, que lo único que se está haciendo es recuperar excedentes de materias primas, con lo que se disminuyen costos de disposición final y compra de materia prima.

Rodríguez (2011), se enfocó en proponer una estrategia para el aprovechamiento de la viruta de aluminio y acero, generada en el taller de diseño mecánico de la Universidad Militar Nueva Granada que generalmente se contamina con sustancias refrigerantes, con el fin de obtener beneficios económicos y ambientales, haciendo una adecuada separación en la fuente, la posterior descontaminación de fluidos y por último la refundición para utilizarla nuevamente en los procesos de mecanizado.

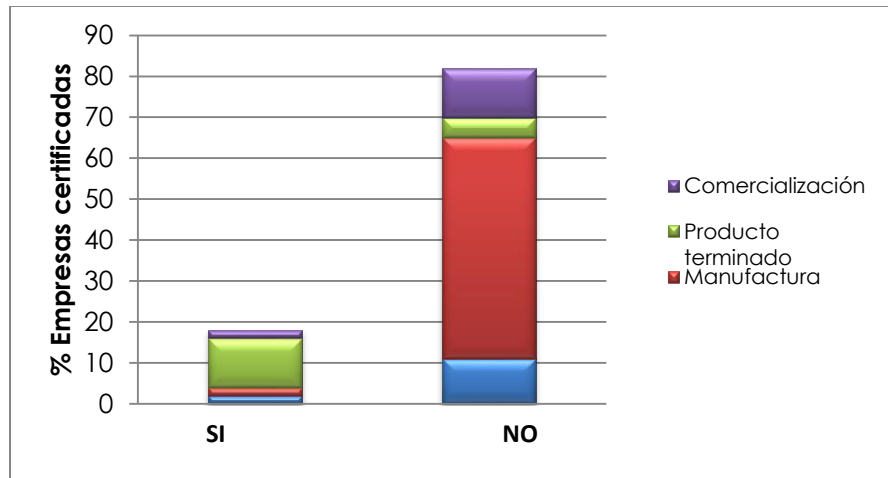
El crecimiento demográfico y la industrialización generan una gran cantidad de residuos que con frecuencia ocasionan importantes problemas ambientales y de salubridad por su tratamiento inadecuado (López, 2010) o por su disposición de forma directa a los cuerpos de agua, causando conflictos entre el sector industrial y la comunidad, lo que ha llevado a las empresas a buscar un mejoramiento continuo de sus procesos y actividades industriales, mediante la implementación de sistemas, no solo de eliminación sino también de minimización, aprovechamiento y reutilización de los recursos presentes en los desechos y subproductos generados diariamente (Rodríguez & Díaz, 2011; Secretaría de ambiente, 2010; Severo et al., 2015; Thangarajan, 2011).

Colombia es un país que tradicionalmente ha sido agrícola, pero, según la Asociación Nacional de Empresarios de Colombia y el Instituto Latinoamericano del Fierro y del Acero (ANDI & ILAFA, 2011) durante la década 2001-2011 tuvo un crecimiento en el sector industrial. En efecto, la industria siderúrgica y metalmeccánica representan el 14%, del total del Producto Interno Bruto (PIB) manufacturero y el 12,12% de la generación de empleo a nivel nacional. Por este motivo, se convirtió en una necesidad imperante, clasificar y manejar adecuadamente los diversos residuos que surgen de la transformación del metal y que son considerados altamente peligrosos para la sostenibilidad de los ecosistemas (Marín, 2009). De ahí que "entre los años 2010 y 2013, las compañías invirtieron 366 millones de dólares y se espera que entre el 2014 y 2017 sean 373 millones de dólares para aumentar capacidad, reducir costos y hacer gestión en medio ambiente" (Ana María Fergusson, directora del Comité Colombiano de Productores de Acero, citada por Portafolio.co., 2014).

Aunque se han evaluado algunas aplicaciones de estos residuos en el sector de la construcción, las industrias cementeras, mezclas asfálticas y la adecuación de suelos (Borsi org, 2015; INCOLMA, 2014), aún se presentan grandes limitaciones en su aprovechamiento, tanto por la humedad con que se generan los residuos sólidos, como por las características recalcitrantes frente a tratamientos fisicoquímicos convencionales de los vertimientos (IQA, 2014), lo que dificulta el cumplimiento de la normatividad ambiental vigente. El acatamiento del Decreto 1076 de 2015 y la participación en procesos de certificación en calidad ambiental se hace indispensable si se quiere evitar sanciones operacionales o económicas, y asegurar la

competitividad frente a los nuevos mercados que se abren por los tratados de libre comercio y poder llegar con confianza a los países desarrollados, como Canadá y los de la Unión Europea (SENA, 2014), ya que como se puede observar en la Figura 1.2, en la actualidad solo el 18% de las empresas del país cuentan con certificaciones ambientales.

Fuente: [periodico.sena.edu.co](http://periodico.sena.edu.co), 2014.



**Figura 1.3.** Certificación ambiental en la cadena metalmeccánica.

En consecuencia, la realización de esta revisión de tema, es de gran importancia para actualizar y guiar a los centros de investigación de la región que estén interesados en desarrollar estudios para minimizar el impacto ambiental de la actividad industrial metalmeccánica en la ciudad de Manizales, mediante la implementación adecuada de tecnologías de biorremediación sobre los residuos generados, aprovechando la reconocida capacidad de algunos grupos microbianos (Mantilla & Ruíz, 2008), para remediar los problemas causados por vertimientos de petróleo y la efectividad en la degradación de compuestos tóxicos y recalcitrantes, como los organoclorados, los lodos cargados de metales pesados y los plásticos (Watanabe, 2001). Además de brindarle a las empresas la posibilidad de generar beneficios económicos inherentes a la reducción de gastos en disposición de residuos peligrosos o el pago de sanciones ambientales, así como, agregar valor a sus residuos industriales y hacer que el proceso de producción sea más rentable y competitivo (Candian et al., 2015).

## 2 REFERENTE TEÓRICO

### 2.1 Generalidades del sector metalmeccánico

El sector metalmeccánico se dedica al aprovechamiento de los insumos obtenidos de la siderurgia, aceros, aluminios, cobres, bronce y derivados para su transformación, ensamble o reparación en bienes intermedios como partes, piezas, maquinarias, equipos y herramientas (PNUD & DPS, 2014; PROPAIS, 2013). De acuerdo a Velosa (2011), "La cadena productiva de la metalmeccánica se integra con otras por medio de artículos para oficina, herramientas y artículos para hogar y ferretería, artículos agropecuarios, artículos de aluminio, envases metálicos, muebles metálicos, maquinaria para otras industrias, máquinas primarias, maquinaria para el sector alimentos, para la minería, agropecuaria, para petroquímica, para metalurgia y madera-textil-impresión, para oficina, para el comercio, y maquinaria para la construcción". En la Figura 2.1 se muestran los principales productos del sector metalmeccánico (PROPAIS, 2013).

Según Trade Map (2014), China es el principal productor mundial de acero crudo y en el año 2010 representaba el 45,85% de la producción mundial, seguido por Japón (7,22%), Norte América (5,79%), Rusia (4,61%) y Alemania con el 2,97% (ANDI & ILAFA, 2011). La producción y exportación de manufacturas de fundición del hierro y acero en el 2014 fueron lideradas por China (19,3%), seguida por Alemania (10,3%) y Estados Unidos (7,2%).

La participación de países latinoamericanos en la industria siderúrgica y metalmeccánica es poco representativa y ha perdido competitividad frente a la estrategia de flujo comercial unidireccional de China (Mendes de Paula, 2012), a pesar de que en estos países la cadena metalmeccánica ocupa un lugar central en su economía, ya que representa cerca del 16% del PIB industrial, tiene una alta incidencia en las exportaciones y aporta una alta tasa de empleos directos e indirectos en el sector. Los países con mayor participación en las exportaciones mundiales de manufacturas de fundición del hierro y acero son México (1,9%), Brasil (0,7%), Argentina (0,3%), Chile y Colombia (0,1%), (Trade Map, 2014).

#### 2.1.1 Sector metalmeccánico en Colombia

Como se explicó anteriormente, para los países latinoamericanos, la industria metalmeccánica tiene una gran importancia interna, y Colombia no es ajena a este comportamiento, ya que el sector se ubica como la tercera industria con mayor importancia en la provisión de insumos para la operación de las demás industrias del país, luego de los productos de la industria extractiva y los combustibles (DANE, 2015).



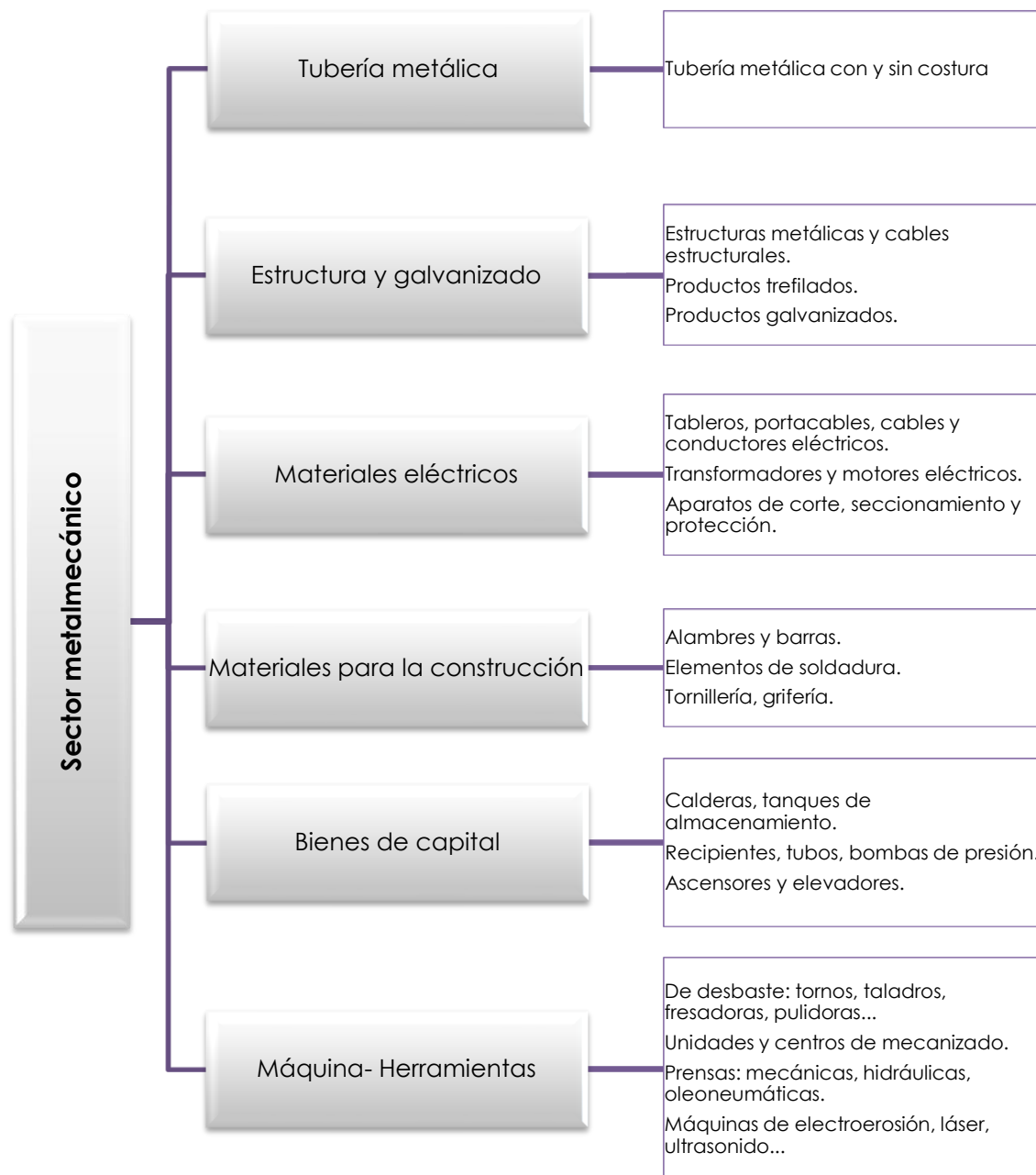


Figura 2.1 Descripción del sector metalmeccánico.

A pesar de la caída de las exportaciones industriales durante el 2014 influenciadas sobre todo por el déficit comercial con China, el sector mostró un crecimiento de 3,5% debido al comportamiento económico interno del país y a la actualización de equipos

y maquinaria para la producción (Industrias Metálicas Miller, 2014). Además desde su inclusión en el 2011 en el Programa de Transformación Productiva (PTP), la industria metalmeccánica colombiana es una de las más importantes y prometedoras del país, ya que exporta más de 363.000 toneladas al año, representa cerca del 14% de la producción industrial nacional y el 15% del empleo dentro del PIB industrial, con un promedio de 90 mil empleos directos y aproximadamente el triple de indirectos (Marca Colombia, 2014).

### **2.1.2 Sector metalmeccánico en Manizales**

La ciudad de Manizales, capital de Caldas, departamento declarado patrimonio inmaterial de la humanidad por la UNESCO por su paisaje cultural cafetero, ha visto ligado su desarrollo industrial a la historia del café como motor económico del país. Desde la segunda década del siglo XX cuando el grano cobró importancia en la economía del departamento, motivó el surgimiento y progreso de otros sectores como el comercial, financiero e industrial, así como el mejoramiento de carreteras y la llegada de medios de transporte a la floreciente ciudad (López, 2004; UNESCO, 2009). La bonanza económica de la época, permitió el desarrollo del sector industrial de la capital caldense que estaba basado, además de las trilladoras, en fábricas para la producción de chocolate, herramientas agrícolas y metalmeccánicas, textiles, fósforos, alimentos y bebidas (DANE, 2015). Debido a las ventajas competitivas que ofrece la región y al liderazgo de los empresarios, la industria metalmeccánica se consolidó y constituye, al día de hoy, uno de los sectores pilares de la economía de Manizales (Alcaldía de Manizales & CCMPC, 2014), al mismo tiempo que el departamento le apuesta al fortalecimiento de la producción agroindustrial, minero-energética y metalmeccánica (PROEXPORT, 2015).

Según el Informe de Coyuntura Económica Regional (ICER) del DANE (2015) el PIB de Caldas, durante el período 2012-2013 creció 6,5% y participó con 1,5 % del PIB nacional (US\$5.018 millones), siendo la industria metalmeccánica de producción de herramientas agrícolas el tercer renglón de las exportaciones no mineras del departamento. Los principales productos de exportación de Caldas para el 2014 fueron el café (68,1%), refrigeradores (5,8%), desperdicios de cobre (4,4%), layas, palas y hachas (3,5%) y productos de confitería (3,1%) a destinos como Estados Unidos (19,7%), Japón (10,8%), Bélgica (10,7%), Ecuador (7,8%) y Alemania (6,8%)(CCMPC., 2015).

En Manizales, el sector metalmeccánico está compuesto por un diverso conjunto de actividades industriales y su desarrollo está influenciado por la dinámica de otros sectores, como el sector de la construcción, automotriz, minero, infraestructura, petrolero, manufactura y agroindustrial; convirtiéndose así, en un sector clave para otras actividades económicas (López, 2004). De acuerdo a la CCMPC (2013),

Manizales es la ciudad del Eje Cafetero que presenta mayor potencial metalmecánico ya que, sumando maquinaria, equipos y otros productos de metal, ésta industria participa con el 33% de las exportaciones no tradicionales y contribuye con el 36% del empleo industrial (2.460 empleos directos y más de 2000 indirectos) y con el 20% del empleo total de la ciudad.

En un estudio realizado en 2014 por la Alcaldía de Manizales - Secretaría de Tecnologías de la Información y la Comunicación (TIC) y Competitividad y la CCMPC, se focalizaron 473 empresas ubicadas en las diferentes comunas de la ciudad, con actividades económicas incluidas dentro del sector metalmecánico. De ésta población se tomó una muestra de 160 empresas a las cuales se les aplicó un instrumento de caracterización, con el que se pudo determinar que las microempresas son las de mayor representación en la ciudad con un 75% de las empresas caracterizadas, luego se encuentra a la pequeña empresa que representa el 19% del sector, el 4%, las medianas y el restante 2% son de categoría grande, de las cuales apenas el 6% de las empresas superan los \$5.000 millones de pesos de facturación anual y el 8% emplean más de 51 trabajadores (Alcaldía de Manizales & CCMPC, 2014), como se puede observar en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Facturación anual y generación de empleos, por parte de la industria metalmecánica.

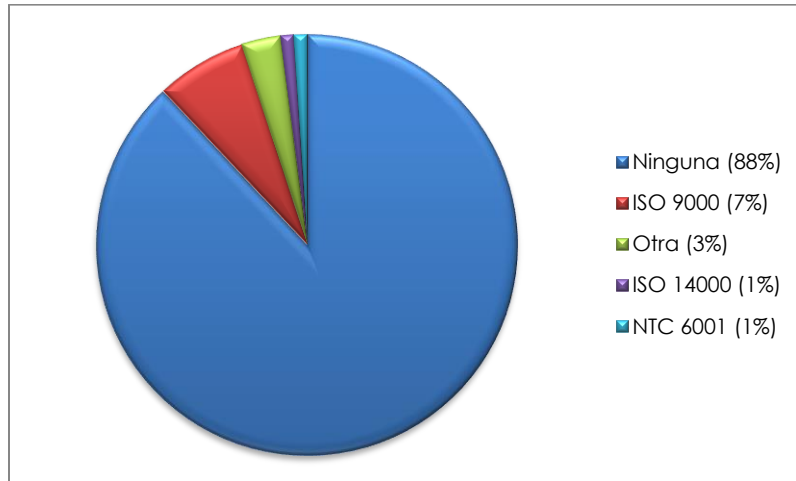
Valor de Facturación anual	Empleos generados				TOTAL
	1-10	11-50	51-200	MÁS DE 200	
<b>\$0-\$30.000.000</b>	46	1	2		49
<b>\$30.000.001-\$50.000.000</b>	23				23
<b>\$50.000.001-\$100.000.000</b>	13	3			16
<b>\$100.000.001-\$300.000.000</b>	23	7			30
<b>\$300.000.001-\$600.000.000</b>	4	9	1		14
<b>\$600.000.001-\$1.000.000.000</b>	1	7			8
<b>\$1.000.000.001-\$5.000.000.000</b>	1	7	2	1	11
<b>\$5.000.000.001-\$10.000.000.000</b>			2		2
<b>Más de \$10.000.000.000</b>	1	1	1	4	7
<b>TOTAL EMPRESAS</b>	112	35	8	5	160

Fuente: Alcaldía de Manizales & CCMPC, 2014

En cualquier tipo de industria, el contar con certificaciones de calidad es un indicador de competitividad que permite ganar confianza en el mercado, asegurar la eficiencia de los procesos, encontrar nuevas oportunidades de negocio y en general mejorar la imagen de la empresa (Equipo editorial buenos negocios, 2013). Sin embargo, el sector metalmecánico manizaleño aún es muy informal frente a este aspecto, tal como lo reveló la caracterización, ya que sólo el 9% de las empresas caracterizadas cuentan

con alguna certificación y se encuentran distribuidas como se ve en la Figura 2.2, de las cuales 4 empresas cuentan con más de una certificación, siendo la más representativa la ISO9000. Dentro de la categoría "otros" aparecen certificaciones referentes al sector autopartes y de laboratorios.

Fuente: Alcaldía de Manizales & CCMPC, 2014.



**Figura 2.2.** Certificaciones con las que cuentan las empresas del sector.

Entre las empresas que se destacan por su tradición en el sector, capacidad de producción, volumen de ventas y actividades de internacionalización, en la fabricación de artículos metálicos como ángulos y perfiles de hierro o acero laminados en caliente, herramientas manuales agrícolas, clavos y puntillas, piezas fundidas, entre otras, se encuentran Bellota, Herragro, Iderna, Invermec, Madeal, Sicolsa, Ternium y Proalco. También se reconoce a Mabe, Iderna Básculas y Prometálicos, como empresas líderes en la producción de maquinaria de uso general (Alcaldía de Manizales & CCMPC, 2014; López, 2004).

### **2.1.3 Residuos generados en los procesos de la industria metalmeccánica**

Aunque el sector metalmeccánico cuenta con diversas actividades industriales, el proceso de manufactura dentro de una empresa metalmeccánica se puede dividir en las etapas básicas que se describen en la Figura 2.3.

Fuente: Sitjes, 2003.



**Figura 2.3.** Etapas básicas de proceso en las empresas metalmeccánicas.

Estas etapas de transformación de las piezas metálicas incluyen operaciones físicas, adición de sustancias químicas y/o el suministro de energía térmica. Algunos de estos procesos pueden ser: corte, torneado, lijado, cepillado, pulido, y desengrasado, los cuales generan diversos residuos entre los que se encuentran: virutas, polvo, grasas y aceites lubricantes usados, refrigerantes, resinas, aserrín, estopas y guantes de lona o carnaza impregnados con aceites o químicos industriales (La Opinión, 2014; Lehnert, 1979; Marín, 2015) que son considerados altamente peligrosos para la salud humana y la sostenibilidad de los ecosistemas por sus "características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables, infecciosas o radioactivas" (Decreto 1076 de 2015), por lo cual se consideran como un aspecto ambiental de alta significancia que debe ser minimizado, atendiendo principios de responsabilidad ambiental, producción limpia y sostenibilidad para dar cumplimiento a la normativa ambiental (INCOLMA INVERMEC S.A., 2014). La clasificación de los residuos generados en cada etapa del proceso y el tratamiento tradicional que se les da, se resumen en la Tabla 2.2.

Como ejemplo específico se puede analizar el proceso de producción de machetes (Figura 2.4.), ya que Colombia, es reconocido como el mayor exportador de esta tradicional herramienta en el mundo (Portafolio.co, 2014) y cuya base de producción está en Manizales, donde la Comercializadora Invermec fabrica al mes hasta un millón de machetes de 850 tipos que exporta a 45 países (Vanguardia.com, 2014).

**Tabla 2.2.** Operaciones que pueden llevarse a cabo en cada etapa del proceso de transformación en una empresa metalmeccánica.

ETAPA	OPERACIÓN	ACTIVIDAD	RESIDUOS GENERADOS	CLASIFICACIÓN	TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN
<b>Recepción de materias primas y almacenaje</b>		En esta fase se producen básicamente residuos de embalajes.	Papel, cartón, plásticos, madera, flejes, etc...	Residuos ordinarios	Separación y reciclaje
<b>Preparación mecánica de las piezas y materiales</b>	Corte	Segmentación de la lámina metálica de acuerdo a la plantilla base.	Polvos metálicos secos y virutas secas procedentes de desbastes.	Residuos metálicos	Recuperación de metales
	Lijado y desbaste	Eliminación de exceso de material de las piezas mediante la exposición a discos abrasivos.	El proceso se realiza en húmedo por lo que se generan lodos residuales con una humedad aproximada de 40%.	Lodos residuales	Secado, almacenamiento y disposición final
<b>Limpieza previa</b>	Limpieza abrasiva	Se utilizan óxidos o carburos metálicos por vía húmeda para eliminar incrustaciones de los materiales.	Polvos metálicos y virutas húmedas de agua o disolventes procedentes de desbastes.	Residuos metálicos húmedos	Decantado y secado - Recuperación de metales
	Limpieza química	Acuosa ácida, acuosa alcalina, con disolventes orgánicos clorados o no, y los correspondientes enjuagues.	Disoluciones acuosas (ácidas, alcalinas, con sales o aditivos) agotadas. Disolventes orgánicos sucios o agotados (clorados o no). Aguas de lavado o aclarado.	Residuos peligrosos	Almacenamiento en depósitos- Empresa gestora autorizada
<b>Mecanizado</b>	Esmerilado	Operación para dar acabado y reducir las proyecciones.	Polvos metálicos secos y virutas secas procedentes de desbastes.	Residuos metálicos	Recuperación de metales
	Torneado	En el torno se maquinan piezas de revolución, donde se efectúan el torneado, cilindrado, roscado y mandrilado.	Virutas metálicas y polvos impregnados de aceites o taladrinas procedentes de mecanizados lubricados.	Posibles residuos metálicos	Decantado, centrifugación y filtrado - Recuperación de metales
	Fresado	Corte del material que se mecaniza con una herramienta rotativa de varios filos, que se llaman dientes.	Polvos metálicos secos y virutas secas procedentes de desbastes.	Residuos metálicos	Recuperación de metales

	Forja	Proceso térmico en el que la pieza se somete a calor (rojo vivo) y luego a una presión mediante golpe en un martillo.	En esta etapa se genera una cascarilla totalmente seca y libre de grasas y aceites.	Residuos metálicos	Recuperación de metales
<b>Tratamientos térmicos</b>	Temple y revenido	Proceso térmico que consiste en someter el metal a altas temperaturas y luego a refrigeración en un fluido para aumentar la resistencia del acero.	En esta etapa se genera un sedimento (Calamina) conformado por una cascarilla metálica (óxido de hierro) en el aceite de temple por lo tanto viene impregnada de este (contiene un 11% aproximado de grasas y aceites).	Posibles residuos metálicos	Decantado, centrifugación y filtrado - Recuperación de metales
	Recocido	Su finalidad es el ablandamiento, la recuperación de la estructura o la eliminación de tensiones internas generalmente en metales.	Virutas metálicas y polvos impregnados de aceites o taladrinas <sup>2</sup> procedentes de mecanizados lubricados.	Posibles residuos metálicos	Decantado, centrifugación y filtrado - Recuperación de metales
	Normalizado	Consiste en calentar la pieza entre 30°C y 50°C por encima de la temperatura crítica superior	Residuos líquidos de aceites, taladrinas, disolventes agotados o sucios. Trapos y papeles sucios, absorbentes impregnados de aceites, grasas, disolventes.	Residuos peligrosos	Almacenamiento en depósitos- Empresa gestora autorizada
	Termoquímicos superficiales	Además de cambios en la estructura, producen cambios en la composición de la superficie.	Disoluciones acuosas (ácidas, alcalinas, con sales o aditivos) agotadas.	Residuos peligrosos	Almacenamiento en depósitos- Empresa gestora autorizada
<b>Acabado</b>	Pulido y biselado	Tratamientos físicos de limpieza de las herramientas.	Se producen limaduras finas y pesadas, de apariencia similar al cemento gris. Se componen esencialmente de óxidos de hierro. Se compactan fuertemente cuando entran en contacto con el agua.	Residuos metálicos	Recuperación de metales
	Cepillado	Para dar acabado a superficies planas y cortar ranuras y surcos.	Polvos metálicos y virutas húmedas de agua o disolventes procedentes de desbastes.	Residuos metálicos húmedos	Decantado y secado - Recuperación de metales

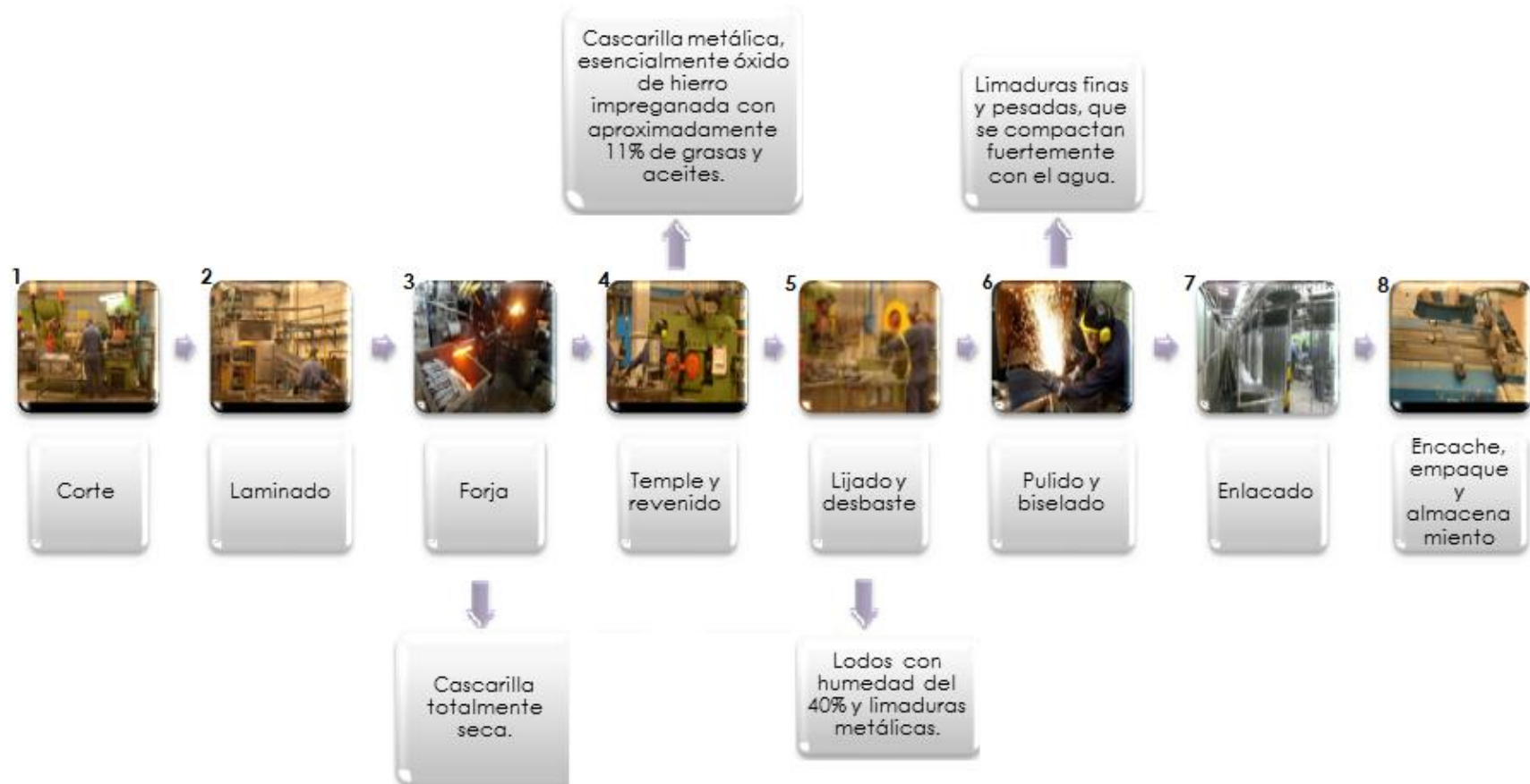
<sup>2</sup> Fluido de corte que se utiliza como lubricante y refrigerante.

	Desengrasado	Utilización de bases ácidas o alcalinas para preparar las piezas metálicas para la aplicación de pintura líquida o en polvo.	Disoluciones acuosas (ácidas, alcalinas, con sales o aditivos) agotadas. Disolventes orgánicos sucios o agotados (clorados o no). Aguas de lavado o aclarado.	Residuos peligrosos	Almacenamiento en depósitos- Empresa gestora autorizada
	Pintura	Con aire comprimido, procedimientos electrostáticos y métodos de recubrimiento de polvo.	Partículas sólidas, pintura en polvo.	Partículas en suspensión	Sistemas de depuración y chimeneas de evacuación
	Lavado	Limpieza del producto terminado.	Residuos del desengrasado de metales y mantenimiento de maquinaria.	Residuos peligrosos	Almacenamiento en depósitos- Empresa gestora autorizada
<b>Empaque y distribución</b>	En esta fase se producen básicamente los mismos residuos de embalajes que en la etapa de recepción de materias primas.				

Fuente: Bronzini et al, 2011; INCOLMA INVERMEC S.A., 2014; Lehnert, 1979; Sitjes, 2003



Fuente: Elaboración propia



**Figura 2.4.** Proceso de producción de machetes y corrientes de residuos peligrosos generados.

Imágenes tomadas de:

<http://www.lapatria.com/galerias/conozca-el-proceso-de-produccion-de-machetes-en-la-fabrica-bellota#13>

#### **2.1.4 Impacto ambiental de la industria metalmecánica**

Como se ha podido observar, el sector metalmecánico, incluye diversas operaciones y actividades, a partir de las cuales se genera una gran cantidad y variedad de sustancias contaminantes para el medio ambiente y la salud humana que se centran en las emisiones atmosféricas, el vertido de aguas residuales y en la generación de residuos sólidos o semisólidos, tal como se describen a continuación, de acuerdo al informe medioambiental del sector metalmecánico, de la Fundación Entorno de España (1998) y a datos proporcionados por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM, 2011).

Aunque las emisiones atmosféricas, ocupan sólo el 0,1% de residuos peligrosos emitidos (IDEAM, 2011), su principal potencial contaminador radica en el fácil transporte de las partículas emitidas a grandes distancias y los trastornos de tipo respiratorio o irritante que pueden ocasionar en la salud. Las dos principales emisiones que se pueden considerar de este tipo son: la emisión generalizada de partículas sólidas en suspensión (de carácter metálico en la mayor parte de los casos) y los gases de combustión correspondientes a los subsectores que implican fundición de metales.

En relación con la generación de aguas residuales, una característica común al sector es su contaminación con metales, además del posible contenido de aceites, disolventes, restos de pinturas y esmaltes, desengrasantes y una alta carga orgánica que causa importantes demandas de oxígeno, lo que puede generar efectos tóxicos para la vida acuática. Las consecuencias medioambientales de estos vertidos se agravan ante el hecho de que representan el 29,9% de los residuos peligrosos (IDEAM, 2011) y que, generalmente, no sufren un tratamiento de acondicionamiento y se disponen directamente en la fuente de agua sin cumplir con la normatividad vigente sobre los vertimientos (Capítulo 3, Decreto 1076 de 2.015). Los principales efectos de las aguas residuales se resumen en la Tabla 2.3.

**Tabla 2.3.** Principales impactos ambientales de las aguas residuales del sector metalmeccánico.

<b>CONTAMINANTES</b>	<b>IMPACTO</b>
$NO_3, PO_4^{3-}, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}$	Eutrofización <sup>3</sup>
Aniones y cationes. Ácidos y bases.	Salinización del medio receptor
DQO <sup>4</sup> , DBO <sub>5</sub> <sup>5</sup> , COT <sup>6</sup> . Aceites y grasas.	Consumo del oxígeno disuelto en el medio receptor
Sólidos en suspensión, turbidez. DQO, DBO <sub>5</sub> , COT. Metales pesados, aceite y grasas	Salud y ecosistemas

**Fuente: Fundación entorno, 1998.**

Por último, la generación de residuos sólidos y semisólidos puede considerarse como el efecto medioambiental más importante del sector, ya que para el año 2011 representaron el 69,9% de los residuos peligrosos, y donde la mayoría, como se puede observar en la Tabla 2.4., están contaminados con aceites, grasas, disolventes orgánicos y otras sustancias químicas altamente tóxicas.

Marín (2015) afirma que, actualmente, Colombia se encuentra en una etapa de transición, concientización y mejoramiento de la gestión de residuos peligrosos, donde su adecuado manejo es un tema de conciencia ambiental y responsabilidad social, y la industria metalmeccánica moderna debe propender por una fabricación limpia, para contribuir a que la producción sea un actor fundamental del cambio y transformación tanto de la empresa como de la sociedad, evidenciando resultados más allá del ahorro de dinero y recursos, en la responsabilidad de la empresa con el medio ambiente y la población.

<sup>3</sup> Acumulación de nutrientes inorgánicos en ecosistemas acuáticos, que causa la proliferación de algas.

<sup>4</sup> Demanda Química de Oxígeno: parámetro que mide la cantidad de sustancias susceptibles de ser oxidadas por medios químicos que hay disueltas o en suspensión en una muestra líquida.

<sup>5</sup> Demanda Biológica de Oxígeno: cantidad de oxígeno que los microorganismos, consumen durante la degradación de las sustancias orgánicas contenidas en la muestra, durante 5 días a 20°C.

<sup>6</sup> Carbono Orgánico Total: cantidad de carbono unido a un compuesto orgánico.

**Tabla 2.4.** Principales impactos de los residuos peligrosos del sector metalmeccánico.

<b>CONTAMINANTES</b>	<b>IMPACTO</b>
Aceites hidráulicos. Absorbentes, trapos sucios, papeles sucios, absorbentes impregnados, etc., de aceites, grasas, disolventes, etc.	Irritantes
Residuos de la formulación, fabricación, distribución y utilización de grasas, detergentes, pintura y barniz. Residuos de moldeado. Residuos de los procesos de tratamiento mecánico de superficie. Aceites hidráulicos y líquidos de freno utilizados.	Nocivos, tóxicos y/o cancerígenos
Residuos de soluciones ácidas. Residuos líquidos y lodos del tratamiento y revestimiento de metales. Residuos líquidos de aceites y disolventes, agotados o sucios.	Corrosivos

**Fuente:** Fundación entorno, 1998.

En Caldas, se desconoce el estado total de generación, tipo y gestión que se realiza con los residuos de la industria metalmeccánica, ya que, como se mencionó anteriormente, la mayoría de las empresas son tipo micropyme que cuentan con poco control por parte de las autoridades medioambientales. La Bolsa de Residuos y Subproductos Industriales BORSI (2015), reporta que las industrias metalmeccánicas más grandes y representativas de la región generan más de 2200 Ton/mes de diferentes tipos de residuos, principalmente escorias y calaminas, los cuales en su mayoría son llevados para disposición final en el relleno o escombreras, ya que el aprovechamiento en el sector de la construcción está limitado a la disponibilidad de obras civiles.

En la Tabla 2.5, se resume la información disponible sobre estos residuos, donde se observan grandes cantidades de los residuos generados; considérese que estos datos no comprenden la totalidad del sector, revelando un gran riesgo ambiental y haciendo evidente la necesidad de desarrollar proyectos de investigación que permitan manejarlos adecuadamente y aprovechar todo el potencial que poseen para su posible valorización en nuevos productos de valor agregado.

**Tabla 2.5.** Tipificación de residuos obtenidos de la industria metalmecánica en el departamento de Caldas.

TIPO DE RESIDUO										
	Nata de fundición/ Escoria (Ton/mes)	Laminilla/ Calamina seca (Ton/mes)	Laminilla/ Calamina húmeda (Ton/mes)	Lodos de lijado (Húmedos con agua) (Ton/mes)	Polvos de pulido seco (Ton/mes)	Discos abrasivos (Óxidos de aluminio y cascarilla de café) (Ton/mes)	Polvos de limadura de broca (Húmedos con aceite) (Ton/mes)	Arena residual (Ton/mes)	Polvo de granalla (Mezcla de arena y hierro) (Ton/mes)	Viruta de machete (Ton/mes)
<b>TOTAL MES</b>	1218	432,5	22	101	9,7	3	7	20	20	1
<b>DISPOSICIÓN ACTUAL</b>	Separación de ferrosos y no ferrosos. Aprovechamiento de ambos. Disposición final.	Disposición final	Horneada para posterior disposición final	Disposición final	Disposición final	Disposición final	Disposición final	Agregado para abono orgánico	Disposición final	Disposición final
<b>USO PROBABLE</b>	Mezclas asfálticas. Afirmado. Mezcla con cemento.	Cementeras. Cerámica. Pinturas y pigmentos.	Cementeras. Cerámica. Pinturas y pigmentos. Industria de Cauchos.	Adoquines, adobes. Mezclas asfálticas. Industrias cerámicas y cementeras.	Adoquines, adobes. Mezclas asfálticas. Industrias cerámicas y cementeras.	Adoquines, adobes. Mezclas asfálticas. Industrias cerámicas y cementeras.	Industria del caucho	Adoquines, adobes. Mezclas asfálticas. Industrias cerámicas y cementeras.	Adoquines, adobes. Mezclas asfálticas. Pigmentos y pinturas. Industrias cerámicas y cementeras.	Adoquines, adobes. Mezclas asfálticas. Pigmentos y pinturas. Industrias cerámicas y cementeras.

Fuente: BORSI, 2015

## 2.2 Tecnologías de tratamiento de residuos peligrosos

Un residuo es cualquier objeto, material o sustancia que es descartado por el generador y no tiene valor de uso directo, pero que es susceptible de aprovechamiento o transformación en un nuevo bien, con valor económico o de disposición final (Decreto 1076 de 2015). Según la Norma Técnica Colombiana GTC 24 de 2009, los residuos se clasifican en Residuos No Peligrosos (que incluyen los residuos aprovechables, no aprovechables y biodegradables), Residuos Peligrosos y Residuos Especiales. Los residuos no peligrosos, pueden ser reutilizados, reciclados o llevados a procesos de compostaje y lombricultivo tradicionales. En cambio, los residuos peligrosos, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables, infecciosas o radiactivas deben ser tratados de manera que se incrementen sus posibilidades de aprovechamiento y/o valorización o se minimicen los riesgos para la salud humana y el ambiente (Decreto 1076 de 2015).

Según el Informe Nacional de Generación de Residuos Peligrosos del IDEAM (2011), Colombia genera, 174.418,7 Toneladas de desperdicios al año, que provienen de hospitales, las industrias química, farmacéutica, energética, textil, petrolera y minera, entre otras. Se estima que la cadena siderúrgica, metalúrgica y metalmecánica produce el 19% de dichos desperdicios (33.139,553 Ton), los cuales, en su mayoría son incinerados (La Opinión, 2014).

Dada la importancia de minimizar estas cantidades de residuos peligrosos y poder disminuir la contaminación ambiental, es necesario que los generadores incorporen tecnologías de tratamiento, las cuales, implican cualquier operación o proceso unitario que altera las características físicas, químicas o biológicas de un residuo, de modo tal que se eliminen sus propiedades nocivas, se reduzca su volumen o simplemente, se haga más fácil su recuperación (Volke & Velasco, 2002; Decreto 1076 de 2015; IDEAM, 2011). Según Benito (2015), algunos residuos tienen la capacidad de ser tratados, pero hay otros cuyo tratamiento es técnicamente y ambientalmente inviable para lo cual se opta por la disposición final o por el envío al exterior. En la actualidad, existen diversas tecnologías disponibles para el tratamiento de residuos y su selección se realiza dependiendo de factores como son: naturaleza del residuo, accesibilidad, objetivos, estándares de seguridad y costos (DESCONT, 2015).

En el país, de acuerdo al informe del IDEAM (2011), el 38,6% de los residuos son procesados mediante tratamientos térmicos, el 20,4% con tratamientos biológicos, 11,8% con tratamientos físico-químicos y el 0,8% con tecnologías avanzadas. Entre estas se encuentran, la electrobiorremediación, que es una tecnología híbrida de

biorremediación y electrocinética para el tratamiento de compuestos hidrófobos orgánicos, en la cual se hace pasar una corriente continua a través del material sólido contaminado y utiliza los fenómenos microbiológicos para la degradación de contaminantes y los fenómenos electrocinéticos para la aceleración y la orientación del transporte de los contaminantes (Megharaj et al., 2011). Así como los procesos avanzados de oxidación (PAO) que hacen uso de diferentes sistemas reactivos, como la catálisis y la fotoquímica, basados en el diseño y construcción de sistemas para el aprovechamiento de la radiación UV o luz visible, de reactores fotoquímicos y métodos de preparación de nuevos fotocatalizadores, que operan usualmente a presión y temperatura ambiente (GilPavas et al., 2011).

Las tecnologías de tratamiento o remediación pueden clasificarse de diferentes maneras (Volke & Velasco, 2002), con base en los siguientes principios:

- **Estrategia de remediación;** que clasifica las tecnologías entre las de modificación de la estructura química, las de destrucción y las de extracción, separación y recuperación de los contaminantes.
- **Lugar en que se realiza el proceso de remediación;** *in situ*, si el tratamiento se realiza en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación, o *ex situ*, si se requiere de excavación, dragado o cualquier otro proceso para remover el residuo.
- **Tipo de tratamiento;** que se basa en el principio de la tecnología de remediación y se divide en tres tipos:

### 2.2.1 Tratamientos Físico-Químicos

Comprenden un conjunto de operaciones de separación y reducción de volumen, así como procesos de transformación del residuo mediante reacciones químicas, que pueden aplicarse individualmente o en serie (Martínez, 2005; Benito, 2015). En la Tabla 2.6., pueden apreciarse los principales tratamientos físico-químicos.

**Tabla 2.6.** Tratamientos físico-químicos aplicados a residuos peligrosos.

TIPO DE TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
<b>Sedimentación</b>	Separa sólidos en suspensión de líquidos generalmente acuosos.
<b>Centrifugación</b>	Concentra partículas suspendidas en un líquido sometido a una fuerza centrífuga.
<b>Autoclave</b>	Esteriliza los residuos mediante calor y presión.

<b>Adsorción</b>	Adhiere contaminantes sobre superficies controladas.
<b>Evaporación-secado</b>	Elimina líquidos retenidos en los lodos
<b>Reducción y oxidación química</b>	Reduce o elimina la toxicidad de los residuos cambiando su estado de oxidación. Es un método muy común para tratar residuos de la industria metalmeccánica. Los reactivos de oxidación más fáciles de usar y económicos son el hipoclorito de sodio o calcio. Entre los reactivos reductores, el sulfato ferroso es el más barato y el más fácil de usar.
<b>Neutralización</b>	La neutralización se usa generalmente para tratar residuos líquidos, pero los lodos y gases también son tratados, cuando exceden el límite de pH que va desde 4.3 a 8.3. El líquido neutralizado es enviado por lo general para sedimentación.
<b>Extracción con solventes</b>	El residuo acuoso que contiene el material disuelto o el material orgánico en suspensión se mezcla con un solvente inmiscible que disuelve el material orgánico. A continuación, se realiza un proceso de separación.
<b>Precipitación</b>	Hace que sustancias solubles se hagan menos solubles o insolubles. El tratamiento es eficaz para aguas residuales de la industria metalmeccánica que contienen metales tóxicos como el arsénico, el bario, el cadmio, el cromo, el cobre, el plomo, el mercurio, el níquel y el zinc. La precipitación puede ser seguida de sedimentación o solidificación y puede estar precedida de oxidaciones y/o reducciones.
<b>Decloración</b>	El cloro es químicamente extraído de los compuestos orgánicos clorados, utilizando reactivos reductores fuertes.
<b>Hidrólisis</b>	La hidrólisis causa la descomposición de las sustancias en el agua y puede ser realizada en ácidos, o en condiciones alcalinas.
<b>Electrólisis</b>	En la electrólisis, se pasa una corriente eléctrica a través de un electrolito (una solución que contiene iones y conduce electricidad). Este es el método utilizado para recuperar la plata de las aguas residuales fotográficas.
<b>Coagulación-Floculación</b>	Es un método común para tratar las emulsiones de aceite/agua como los lubricantes y otros aceites solubles en agua. Esto implica la agregación de partículas finas de una solución, añadiendo coagulantes a la mezcla. El siguiente paso es la floculación, donde la agregación de las partículas causa la formación de coágulos que sedimentan fácilmente.
<b>“Stripping”/Desorción</b>	Separa los componentes volátiles del líquido, sometiéndolos a una corriente de gas
<b>Lixiviación</b>	Elimina los componentes solubles del material sólido
<b>Irradiación de UV/Ozonólisis</b>	Separa los componentes peligrosos mediante ozono/energía
<b>Intercambio de iones</b>	Intercambio con especies iónicas disueltas mediante el contacto con resinas.

Fuente: Benito, 2015; Colombia, Ministerio de ambiente/OCAD, 2007.



### 2.2.2 Tratamientos Térmicos

Son los métodos que utilizan calor para volatilizar (separar), quemar, descomponer (destruir) o fundir (inmovilizar) los contaminantes en un suelo o material sólido (Volke & Velasco, 2002; Martínez, 2005); éstos se encuentran relacionados en la Tabla 2.7.

**Tabla 2.7.** Tratamientos térmicos aplicados a residuos peligrosos.

TIPO DE TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
<b>Incineración</b>	Combustión completa utilizando el oxígeno en exceso.
<b>Coprocesamiento</b>	Utilización de la misma unidad de producción de clinker <sup>7</sup> para la combustión de residuos.
<b>Pirólisis</b>	Descomposición térmica en ausencia total de oxígeno.
<b>Gasificación</b>	Combustión incompleta en ausencia parcial de oxígeno.
<b>Arco de plasma</b>	Volatilización y posterior combustión del residuo por contacto con un gas energizado. La tecnología es aplicable a residuos orgánicos líquidos finamente divididos y puede ser utilizada para residuos con alto contenido de cloro, pesticidas, PCB, dioxinas y furanos.
<b>Oxidación en sal fundida</b>	Oxidación sin llama, desarrollada a temperaturas entre 1500°C y 2000°C, donde las sustancias orgánicas son oxidadas por el oxígeno en una cámara de reacción donde se encuentra una sal alcalina fundida.

**Fuente:** Benito, 2015; Colombia, Ministerio de ambiente/OCAD, 2007.

La incineración es el método más empleado por las industrias para destruir sus contaminantes, por la facilidad de aplicación y la reducción del volumen de los residuos, a pesar de las emisiones de gases tóxicos que genera (IDEAM, 2011).

### 2.2.3 Tratamientos Biológicos

Los tratamientos biológicos o biorremediación utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar (destruir), transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos (Volke & Velasco, 2002).

En el caso de los residuos tóxicos, estos tratamientos tienen una aplicación limitada, ya que los microorganismos suelen ser muy sensibles a las concentraciones de los contaminantes, así como a la temperatura y el pH (Martínez, 2005). Sin embargo, existen microorganismos extremófilos con características adaptativas que les confieren tolerancia a factores físicos y/o

---

<sup>7</sup> Mezcla fundida de arcilla y caliza para la producción de cemento.

químicos extremos, como alta o baja temperatura, acidez, salinidad, alta concentración de metales y sustancias tóxicas, entre otros (Capdevielle et al., 2010). Igualmente, tienen la capacidad de utilizar los contaminantes como fuente de carbono y/o energía (Astashkina et al., 2015; Lladó et al., 2012; Rodríguez et al., 2015).

Además, mediante la ingeniería genética se ha logrado mejorar la resistencia de los microorganismos a condiciones adversas y/o acelerar los procesos metabólicos para lograr la degradación de ciertas sustancias (Megharaj et al., 2011). Las técnicas más comunes de biorremediación se resumen en la Tabla 2.8.

**Tabla 2.8.** Tratamientos biológicos aplicados a residuos peligrosos.

<b>TIPO DE TRATAMIENTO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
<b>Biorreactores de suelos activados (RSA, o "Slurry Bioreactors")</b>	El tratamiento de los materiales contaminados se realiza en fase acuosa y es mantenido en suspensión mediante agitación, lo cual permite mayor transferencia de masa, y tiempos de tratamiento relativamente menores.
<b>Reactor Biológico rotativo de contacto (RBC) o Biodiscos</b>	Sistema de tratamiento biológico secundario, para aguas residuales domésticas e industriales biodegradables. Los microorganismos responsables del tratamiento se adhieren a los discos, los cuales giran poniendo en contacto a la biomasa con el sustrato y el oxígeno.
<b>Compostaje</b>	Proceso mediante el cual diversos sustratos orgánicos se descomponen de manera aeróbica o anaeróbica y se estabilizan debido a la acción de una población mixta de microorganismos.
<b>Digestión anaerobia</b>	Degrada los residuos orgánicos en ausencia de oxígeno.
<b>Landfarming<sup>8</sup></b>	Los materiales contaminados son esparcidos en una superficie impermeable con un sistema incorporado para recoger cualquier lixiviado. Se aran para oxigenar, se riegan y se añaden nutrientes, para generar materiales inocuos para el ambiente, o subproductos estabilizados que no representan peligro.
<b>Fitorremediación</b>	Aprovechamiento de la capacidad de ciertas especies vegetales para extraer del suelo a través de sus raíces, contaminantes inorgánicos tales como metales pesados y acumularlos en su tejido vegetal.
<b>Utilización de microalgas</b>	Proceso enfocado principalmente a la remoción de nutrientes y de metales pesados presentes en las aguas residuales.

**Fuente:** Behling et al., 2003; Benito, 2015; Colombia, Ministerio de ambiente/OCAD, 2007.

Como se mencionó anteriormente la selección del tipo de tratamiento depende de factores como la naturaleza del residuo, potencialidad de recuperación de materiales, aprovechamiento energético, requerimientos de instalaciones y/o

<sup>8</sup> Anglicanismo para describir un tratamiento aerobio de suelos contaminados.

transporte, o la disposición final de los residuos producidos durante el tratamiento. Por esto, en la Tabla 2.9., se hace una comparación básica de las ventajas y desventajas de cada uno. En general, la biorremediación presenta como principales ventajas sobre los métodos de tratamiento convencionales, los bajos costos, alta eficiencia, la minimización de lodos, y la posibilidad de recuperación de metales (Abdul Jaffar ali et al., 2015).

De esta comparación, y de acuerdo al objetivo de este trabajo, el cual está orientado a brindar una opción de tratamiento para los residuos de la industria metalmeccánica que se muestran recalcitrantes a los métodos fisicoquímicos convencionales, en la siguiente sección se profundizará en el análisis de los tratamientos biológicos o de biorremediación.

**Tabla 2.9.** Ventajas y desventajas de los tipos de tratamiento aplicados sobre los residuos peligrosos.

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<b>Fisicoquímicos</b>	Presentan una buena relación costo/beneficio.	Los residuos generados por técnicas de separación, deben ser tratados o dispuestos posteriormente.
	Necesitan periodos cortos de acción.	Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad de los contaminantes.
	El equipo es accesible y requieren bajos gastos energéticos.	Necesitan varias etapas de recuperación y purificación de sustancias.
<b>Térmicos</b>	Son aplicables a una gran variedad de residuos.	Generan emisiones de gases tóxicos.
	Permiten una gran reducción de volumen.	Requieren un gran gasto energético y son más costosos.
<b>Biológicos</b>	Presentan una buena relación costo/beneficio.	Requieren mayores tiempos de tratamiento.
	Son tecnologías amigables con el ambiente.	Es necesario verificar la toxicidad de los intermediarios y productos.
	Aunque algunas veces se puede requerir operaciones de acondicionamiento o de separación, los costos y el impacto ambiental son menores frente a los tratamientos térmicos y fisicoquímicos.	Los organismos son muy sensibles a las condiciones ambientales y concentración de sustancias tóxicas.

**Fuente: Volke & Velasco, 2002.**

## 2.3 Biorremediación

La biodegradación o biorremediación, como se conoce desde los años 70, es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los organismos (Megharaj et al., 2011) para remover, degradar o transformar contaminantes orgánicos de suelos, aguas y emisiones gaseosas, en compuestos más simples como dióxido de carbono, sales inorgánicas, agua y biomasa (Ferrera et al., 2006; Lladó, 2012; Vásquez et al., 2010). El uso de la biodegradación se generalizó para remediar los problemas causados por vertimientos de petróleo al mar, y poco a poco ha encontrado otras aplicaciones en la degradación de compuestos tóxicos y recalitrantes como los organoclorados, los lodos cargados de metales pesados y los plásticos (Megharaj et al., 2011; Watanabe, 2001).

El éxito cualitativo y cuantitativo de la biorremediación depende de las condiciones ambientales de la zona donde se realiza el proceso. Realp et al., (2008) y Thangarajan et al., (2011) citan entre ellas: la disponibilidad de oxígeno, por la mayor eficiencia de los procesos aeróbicos sobre los anaeróbicos; la humedad, ya que los microorganismos requieren un contenido de agua disponible entre el 30% y el 80% para sobrevivir; la presencia de nutrientes como nitrógeno y fósforo que son necesarios para el metabolismo; un rango de temperatura mesofílico entre 20°C y 40 °C, y un pH entre 7,4 y 7,8 para la degradación de hidrocarburos, ya que éste afecta tanto a la actividad microbiana como a la solubilidad y adsorción de contaminantes.

Las técnicas de biorremediación pueden aplicarse *in situ* o *ex situ*. En los tratamientos *in situ*, los residuos son tratados en su emplazamiento natural, mientras que en los *ex situ* el material contaminado es transportado hasta la localización donde se implementará la tecnología (Lladó, 2012; Megharaj et al., 2011), considerándose los tratamientos *In situ* más amigables con el medio ambiente y particularmente atractivos debido a su bajo costo y mantenimiento sencillo (Agnello et al., 2015; Menendez-Vega et al., 2007). La biorremediación, como se observa en la Figura 2.5., puede darse de forma natural (bioatenuación) (González, 2011; Megharaj et al., 2011); por bioestimulación, que consiste en la adición y suplementación de nutrientes, agua o electrones donantes o aceptores, y el acondicionamiento fisicoquímico del medio para estimular la eliminación de los contaminantes; o por bioaumentación, que corresponde al aumento de la cantidad de organismos con catabolismo<sup>9</sup> apropiado para acelerar la degradación, ya sean organismos autóctonos, exógenos, modificados

---

<sup>9</sup> Fase exergónica del metabolismo en la que las biomoléculas complejas se transforman en moléculas sencillas.

genéticamente (GEM), en consorcios o formando biopelículas (Agnello et al., 2015; Sprocati et al., 2012; Thangarajan, 2011).

Las tecnologías de biorremediación basadas en los principios de bioestimulación y bioaumentación incluyen *bioventing*<sup>10</sup>, *landfarming*, biorreactores de suelos activados (*slurry bioreactors*), compostaje, fitorremediación, utilización de microalgas y fitorremediación asistida por microorganismos, entre otros (Agnello et al., 2015; Ferrera-Cerrato et al., 2006; González, 2011; Khan et al., 2004; Megharaj et al., 2011).

Fuente: elaboración propia.

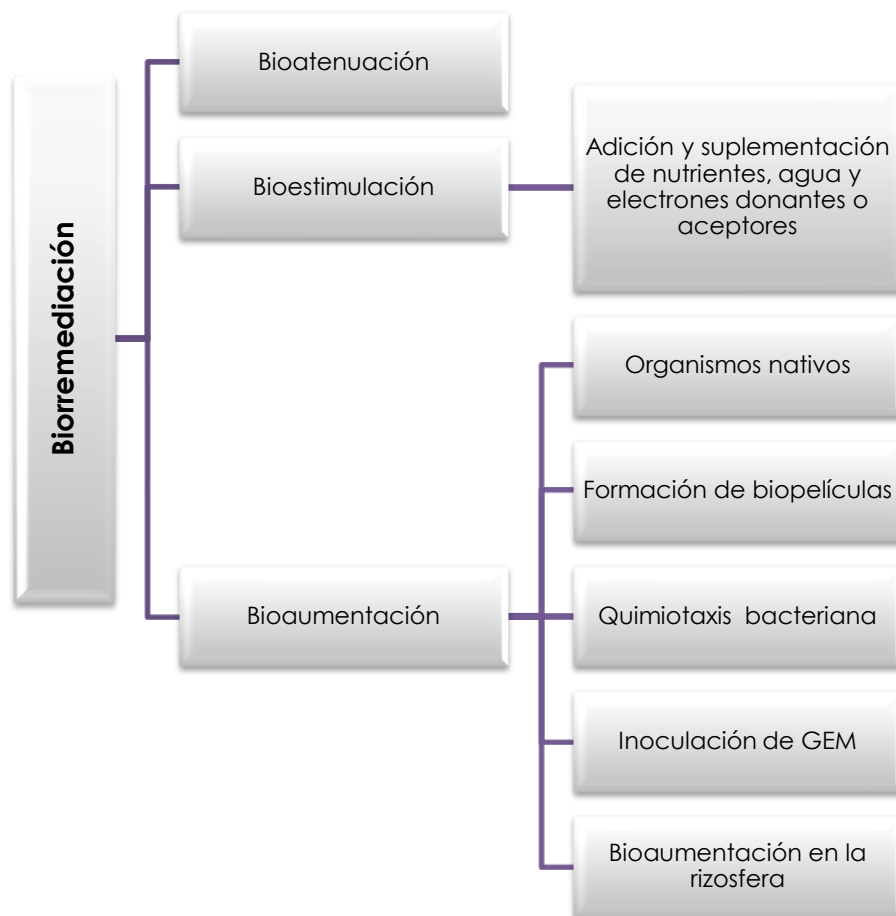


Figura 2.5. Estrategias de biorremediación.

<sup>10</sup> Anglicanismo para describir la tecnología que estimula la biodegradación de residuos *in situ* mediante la circulación de aire.

### **2.3.1 Reactores de Suelos Activados (RSA)**

Los reactores de suelos activados o "Bioslurry systems" son una técnica de restauración *ex situ* que se lleva a cabo en sistemas de biorreactores bajo condiciones ambientales controladas, para tratar zonas contaminadas con alto contenido de materia orgánica y/o compuestos tóxicos recalcitrantes presentes en altas concentraciones. (Cronje et al., 2002; Ferrera-Cerrato et al., 2006). Este sistema, consiste en un tanque con control de nutrientes, oxígeno y pH, y agitación mecánica que permite la mezcla de la suspensión de biomasa conocida como "floc biológico" y el efluente contaminante, para favorecer la biodegradación (Mañunga et al., 2012). Según Khan et al., (2004) y González (2011), ésta técnica de biorremediación provee un aumento en la transferencia de masa y contacto de los microorganismos con los contaminantes/nutrientes; lo que lleva a mayores tasas de biodegradación de los contaminantes en tiempos más cortos de tratamiento y, una vez finalizado el proceso, el lodo resultante es desecado y puede ser devuelto a su lugar de origen. Según Ferrera-Cerrato et al., (2000) los grupos microbianos importantes identificados en tratamientos con RSA incluyen bacterias pseudomonadales, actinomicetos, bacterias metanótrofas y deshalorrespiradoras, algunas arqueas como las metanogénicas, y más recientemente, aunque no en escala comercial, hongos ligninolíticos.

Por último, de acuerdo a Ferrera-Cerrato et al., (2000) y Khan et al., (2004) aunque el tratamiento mediante RSA, es relativamente simple, versátil y controlado, su mayor desventaja corresponde al aumento en los costos, por el transporte del material, construcción y operación de los biorreactores y el manejo posterior de los lodos y las aguas residuales.

### **2.3.2 Compostaje**

El compostaje es un proceso biológico de estabilización de residuos mediante la oxidación controlada de materia orgánica biodegradable, para generar dióxido de carbono, agua, energía calórica y "compost", gracias a la acción de diversos microorganismos (APROLAB, 2007), por lo que se constituye en una forma de fermentación en estado sólido para el control ambiental (Santis, 2013). Las aplicaciones más comunes del compostaje incluyen el tratamiento de residuos agroindustriales, desechos de jardinería y cocina, desechos de la madera como el aserrín y las virutas, residuos sólidos municipales y de lodos (Velasco & Volke, 2003). Sin embargo, también ha demostrado ser un proceso efectivo para remediar suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), compuestos monoaromáticos, explosivos, clorofenoles, diversos pesticidas e hidrocarburos del petróleo como el diesel (Ferrera-Cerrato et al., 2006; Semple et al., 2001). Otro tipo de contaminantes recalcitrantes, son los metálicos que

pueden encontrarse en diversos residuos y, a diferencia de los contaminantes orgánicos, no son retirados significativamente durante el compostaje. Las transformaciones microbianas de los metales durante este proceso corresponden básicamente a reacciones de oxidación y reducción, que influyen en la solubilidad y biodisponibilidad para la adsorción a moléculas orgánicas, lo que reduce su toxicidad (Moreno & Moral, 2007).

Al igual que para el compostaje de desechos no peligrosos, en el compostaje de residuos recalcitrantes, es necesario controlar la aireación, la temperatura, el contenido de humedad, la relación carbono/nitrógeno (C/N) y el pH (Abarralde, 2005). Debido a que los contaminantes orgánicos generalmente están compuestos solo por carbono e hidrógeno (Realp et al., 2008), deben mezclarse con sustancias orgánicas sólidas biodegradables (agentes de volumen) que aseguren el balance y la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos, además de aumentar la porosidad, y, con esto la aireación y capacidad de retención de agua de las pilas (Ferrera et al., 2006; Jorgensen et al., 2000). En la Tabla 2.10 se muestran las características deseables de la mezcla de materiales de partida para llevar a cabo el compostaje:

**Tabla 2.10.** Parámetros iniciales para el compostaje de la mezcla de materiales contaminados por compuestos orgánicos.

CARACTERÍSTICA	RANGO RAZONABLE	RANGO PREFERIDO
Relación C/N	20-40	25-30
Contenido de humedad	40-65%	50-60%
pH	6-8	6,5-7,5
Relación material contaminado/aditivos	1,5:1 – 3:1	2:1
Contaminantes		<50000 mg/kg
Metales tóxicos		<2500 mg/kg
Conteo bacteriano		>1000 UFC/g mezcla

Fuente: Negro, 2000; Velasco & Volke, 2003.

### 2.3.2.1 Fases del compostaje aerobio

Según Mantilla & Ruíz (2008), y tal como se muestra en la Figura 2.6. , el proceso de compostaje puede dividirse en cuatro períodos, de acuerdo con la evolución de la temperatura.

- **Fase Mesófila:** el proceso inicia a temperatura ambiente permitiendo la multiplicación rápida de microorganismos mesófilos, que producen ácidos orgánicos que disminuyen el pH y, se incrementa la temperatura, como consecuencia de la actividad metabólica.

- **Fase Termófila:** se da a temperaturas entre 40°C y 70 °C. Los microorganismos termófilos transforman el nitrógeno en amoníaco, causando una alcalinización del medio.
- **Fase de enfriamiento:** luego de alcanzar el punto de estabilidad, empieza a disminuir la temperatura, reapareciendo los hongos termófilos celulolíticos y los microorganismos mesófilos causando una ligera disminución del pH.
- **Fase de maduración:** es la última fase; en ésta, la temperatura disminuye hasta temperatura ambiente, actuando mohos y actinomicetos que contribuyen a la estabilidad del compost mediante reacciones secundarias de condensación y polimerización.

Fuente: [www.agroterra.com](http://www.agroterra.com).

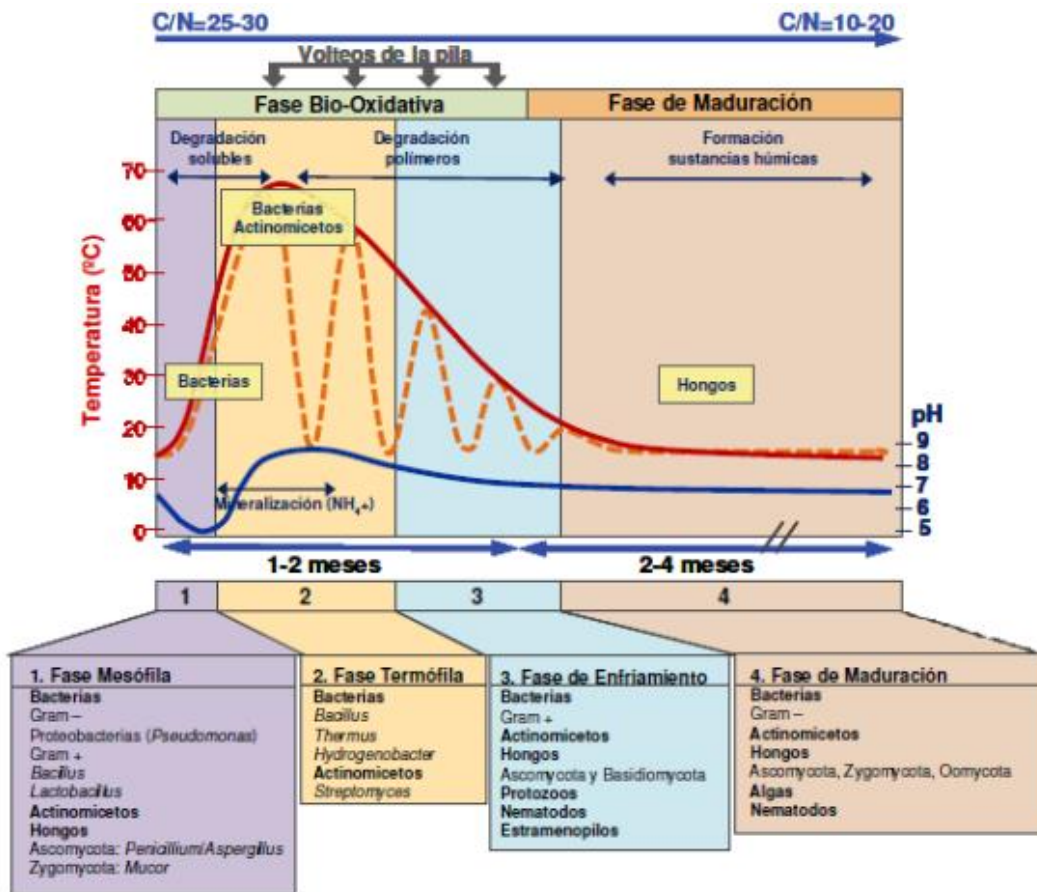


Figura 2.6. Etapas del proceso de compostaje en función de la temperatura.

La adición de inóculos (bacterias, hongos y levaduras) a la mezcla inicial, induce y acelera la descomposición de la materia orgánica reduciendo el tiempo de biodegradación (APROLAB, 2007).



### 2.3.2.1 Ventajas y desventajas del compostaje

En la Tabla 2.11., se resumen las consideraciones que hace Khan et al., (2004) sobre la tecnología de compostaje.

**Tabla 2.11.** Ventajas y desventajas del compostaje como técnica de biorremediación.

<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
Tecnología fácil de diseñar y poner en práctica.	Concentraciones muy altas de contaminantes pueden inhibir la biodegradación.
Tiempos de tratamiento cortos (6 meses-2 años).	Poco efectivo a concentración > 50.000 ppm de hidrocarburos del petróleo.
Un sistema cerrado puede controlar las emisiones de vapor.	Concentraciones de metales pesados > 2.500 ppm pueden inhibir el crecimiento microbiano.
Adaptable a diferentes condiciones ambientales.	En sistemas abiertos, puede darse evaporación de contaminantes.
Reducción de contaminantes hasta de 95%.	Es necesario contar con un espacio adecuado para montar los sistemas.
Se requiere poco personal para operación y mantenimiento.	Requieren mayor tiempo de tratamiento que los físicos y químicos.

Fuente: Khan et al., 2004

### 2.3.3 Fitorremediación asistida por microorganismos

La fitorremediación es el proceso de enmienda de suelos y aguas subterráneas contaminadas utilizando la capacidad de las plantas para asimilar, acumular y/o degradar sustancias, especialmente metales (Khan et al., 2004). Megharaj et al., (2011) y Ullah et al., (2015) describen las principales técnicas de fitorremediación, las cuales se resumen en la Tabla 2.12.

**Tabla 2.12.** Resumen de las técnicas de fitorremediación.

<b>TÉCNICA</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Rizodegradación	Los microorganismos de la rizósfera ayudan en la degradación de xenobióticos orgánicos.
Fitovolatilización	Los contaminantes se volatilizan y se liberan a la atmósfera.
Fitoextracción	Los contaminantes se acumulan en la biomasa.
Fitotransformación	Transformación de compuestos altamente tóxicos en formas menos tóxicas.
Fitodegradación	Degradación de xenobióticos orgánicos mediante las enzimas de la planta dentro de los tejidos vegetales.
Fitoestabilización	Se limita la movilidad de los contaminantes por las raíces de las plantas en la rizosfera.
Fitofiltración	Secuestro por medio de plantas, de contaminantes de aguas contaminadas.

Fuente: Ullah et al., 2015.

La rizodegradación o biorremediación asistida por microorganismos, es una tecnología reciente y muy efectiva en la recuperación de suelos contaminados con metales pesados (Juwarkar, 2012), que está basada en el potencial metabólico de los microorganismos asociados a las raíces, aprovechando las interacciones planta-suelo-microorganismos. Estos microorganismos transforman los metales pesados en formas solubles y biodisponibles, que en consecuencia, facilitan la fitorremediación, además, de que producen agentes promotores del crecimiento de plantas, apoyando indirectamente la tecnología de fitorremediación (Ullah et al., 2015). Algunos de los mecanismos propios de los microorganismos que permiten una mayor absorción de metales por las plantas son: producción de sideróforos, ácidos orgánicos, biosurfactantes, procesos de biometilación y redox (Juwarkar, 2012; Ullah et al., 2015).

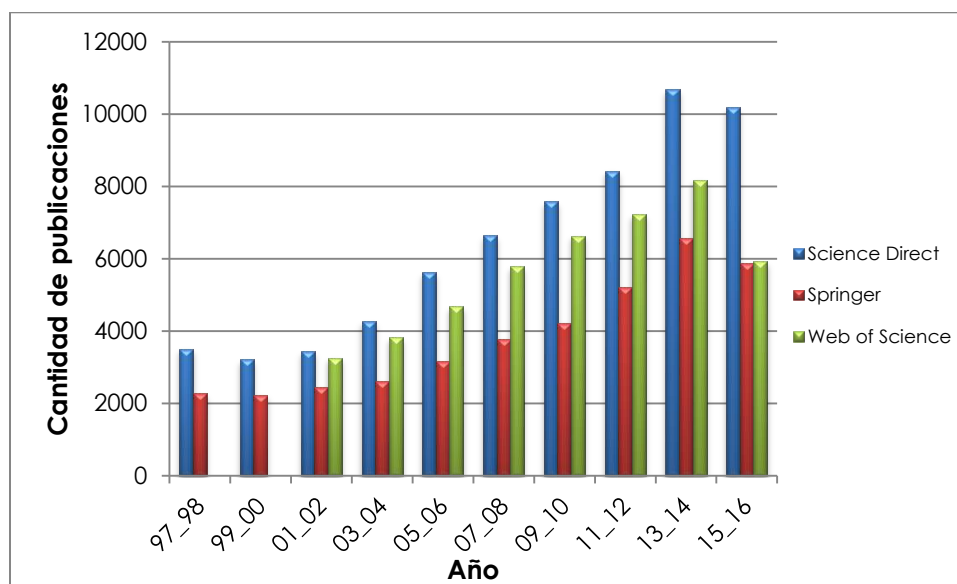
Como se puede observar, existen muchas técnicas de biorremediación las cuales dependen de factores biológicos, químicos y físicos que deben ser tenidos en cuenta para escoger la que presente mayor potencialidad de éxito de acuerdo al tipo de residuo a tratar (Realp et al., 2008; Thangarajan et al., 2011). Por esto, a continuación, se analizará el estado del arte en procesos de biorremediación aplicados a los residuos contaminados con aceites y grasas de la industria metalmeccánica, recopilando las investigaciones más relevantes que se han realizado sobre el tema y haciendo un análisis de los aspectos significativos que permitan cimentar una propuesta de aplicación a nivel industrial.

### 3 BIORREMEDIACIÓN DE RESIDUOS CONTAMINADOS CON GRASAS Y LUBRICANTES

#### 3.1 Estado del arte

El uso de la biotecnología para la degradación de contaminantes orgánicos e inorgánicos se ha generalizado a nivel mundial. Prueba de ello, son los casi 150.000 artículos publicados en los últimos 20 años referidos a las palabras clave de biorremediación y biodegradación que aparecen referenciados en algunas de las bases de datos más importantes de la comunidad científica, como se muestra en la Figura 3.1.

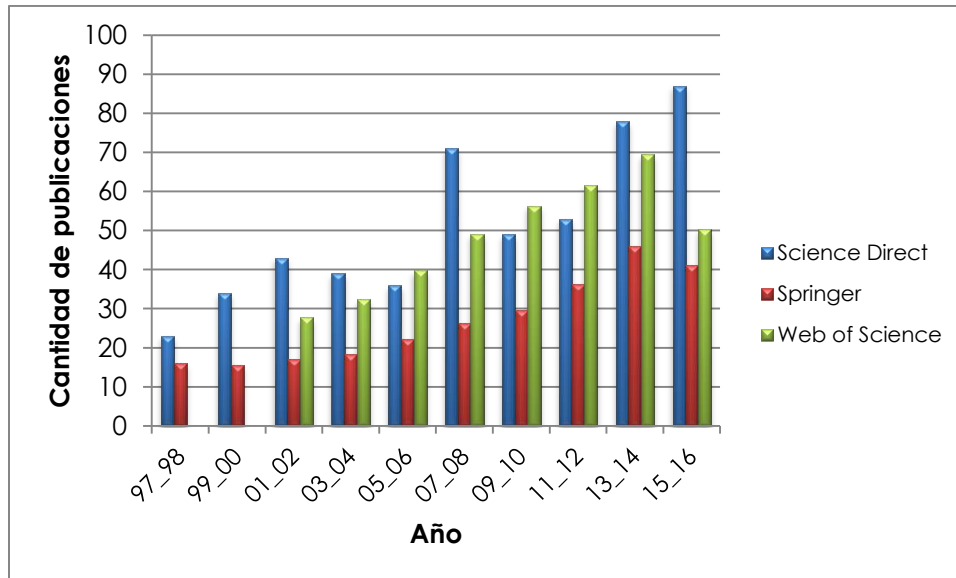
Fuente: Elaboración propia



**Figura 3.1.** Artículos publicados desde 1997 sobre biorremediación/biodegradación en revistas de investigación científica internacional referenciados en las bases de datos Science Direct, Springer y Web of Science.

Cuando se especifica la búsqueda a “biorremediación/biodegradación de residuos industriales contaminados con grasas y lubricantes”, se observa que los resultados se reducen notablemente, como se indica en la Figura 3.2. En estos artículos se evalúan residuos de diferente origen, siendo en su mayoría hidrocarburos derivados del petróleo, pero siendo muy limitada la información específica sobre residuos procedentes de la industria metalmeccánica.

Fuente: Elaboración propia



**Figura 3.2.** Artículos publicados desde 1997 sobre biorremediación/biodegradación de suelos contaminados con aceites y lubricantes industriales referenciados en las bases de datos Science Direct, Springer y Web of Science.

Ante este panorama, en la presente monografía, se han elegido los reportes de estudios experimentales y revisiones previas sobre biorremediación de suelos y materiales sólidos contaminados con grasas y/o aceites minerales que permitan dilucidar los aspectos claves necesarios para la aplicación de un tratamiento de biodegradación a los residuos metalmeccánicos.

Como revisión de tema se destacan las consideraciones de Singer et al., (2005) sobre los aspectos a tener en cuenta para identificar y seleccionar cepas más promisorias para los tratamientos de bioaumentación, ya que la supervivencia de los microorganismos inoculados durante el tratamiento, es uno de los factores más limitantes en esta técnica de biorremediación (Sprocati et al., 2012). Los autores señalan el enfoque tradicional que comprende la transmisión hereditaria y mejora de las habilidades catabólicas excepcionales de algunos microorganismos para desempeñarse eficientemente en ciertas tareas y entornos, y la selección de cepas rizo-dirigidas aprovechando las relaciones simbióticas que se generan entre la planta y los microorganismos capaces de crecer en los exudados de la raíz, además de degradar el contaminante correspondiente. También hacen énfasis en el potencial que ofrece la técnica de "cebado", la cual consiste en preparar a los microorganismos para las condiciones futuras en las que deberán llevar a cabo una función.

También es de gran relevancia, el trabajo de Chen et al., (2015) sobre el uso del compostaje en la biorremediación de suelos cargados con contaminantes

orgánicos y metales pesados, en el cual describen aspectos microbiológicos y discuten algunos problemas que necesitan mayor investigación tales como la biodisponibilidad del contaminante, la mineralización<sup>11</sup> de la materia orgánica y la calidad del compost utilizado en dichos procesos.

A nivel experimental, en Colombia, son pocas las investigaciones realizadas sobre biorremediación, las cuales han sido enfocadas principalmente al tratamiento de hidrocarburos aromáticos y metales pesados en suelos (Narváez-Flórez, 2008). El Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de los Andes ha desarrollado diferentes estudios encaminados al aislamiento y bioaumentación de bacterias nativas degradadoras de crudo en suelos impactados por derrames del oleoducto Caño Limón Coveñas (Vargas et al., 2004; CIMIC, 2007). En otros estudios, Pardo et al., (2004) trataron suelos a través de *landfarming* con adición de nutrientes *in vitro*, obteniendo porcentajes de degradación de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) hasta del 91% luego de cuatro meses de tratamiento. Vallejo et al., (2005) evaluaron la bioestimulación con sales inorgánicas simples y con un fertilizante inorgánico compuesto, en la biodegradación de HTP empleando mesocosmos de suelo contaminado artificialmente, de lo cual obtuvieron una degradación del 39% a 41% luego de 125 días de tratamiento. Además del estudio realizado por Vásquez et al., (2010) bajo el macroproyecto de "Biorremediación de lodos contaminados con aceites usados" de la Universidad de Santander, en el cual, analizaron la degradación mediante la bioaumentación con cepas nativas de bacterias y hongos, en biopilas formadas por lodos contaminados con residuos de aceites usados, provenientes de lavaderos de carros y lodos de alcantarillado de una zona industrial mezclados con lodos deshidratados obtenidos a partir del tratamiento primario de aguas residuales domésticas, logrando un porcentaje de remoción de hasta 95% luego de 120 días de tratamiento.

A nivel internacional, las investigaciones desarrolladas apuntan principalmente al tratamiento de aguas residuales y de suelos, pero, de acuerdo con los objetivos de esta revisión, se hace énfasis en las segundas, ya que los residuos sólidos en general, se disponen directamente sobre el suelo. La mayoría de estudios, evalúa y compara los efectos de la atenuación natural, la bioestimulación y la bioaumentación sobre la degradación de HTP en suelos contaminados por actividades industriales o contaminados específicamente a nivel experimental (Agnello et al., 2015; Arrieta et al., 2012; González et al., 2012; Lee et al., 2007; Lladó et al., 2012; Menéndez-Vega, 2007; Menezes et al., 2003; Thangarajan et al., 2011).

---

<sup>11</sup> Transformar la materia orgánica contaminante a dióxido de carbono, agua y biomasa (Megharaj et al., 2011).

Para la bioestimulación, en general, se utilizaron sales inorgánicas simples como fuente de nitrógeno y fósforo (Arrieta et al., 2012; Lee et al., 2007; Lladó et al., 2012; Menezes et al., 2003; Thangarajan et al., 2011), aunque otros se atrevieron a aplicar sustancias más específicas, como fertilizantes oleofílicos que solubilizan los nutrientes en la interfase agua-petróleo y agentes tensoactivos (Lladó et al., 2012; Menéndez-Vega et al., 2007), que aumentan la superficie de contacto agua-petróleo acelerando la degradación. Por otro lado, para la bioaumentación utilizaron consorcios bacterianos donde predominaban cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, seguidos de *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, y algunos representantes de los géneros *Achromobacter*, *Microbacterium*, *Ochrobactrum*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus*, *Delftia*, *Exiguobacterium*, *Paenibacillus*, *Sanguibacter*, entre otros (Agnello et al., 2015; Arrieta et al., 2012; González et al., 2012). Lladó et al., (2012) además del consorcio bacteriano, introdujeron la cepa ligninolítica *Trametes versicolor* con lo que se produjo un cambio significativo en la biodiversidad detectable de la comunidad bacteriana endógena y se obtuvo mayor degradación. Otros investigadores se apoyaron en la tecnología de compostaje de los suelos con aplicación de compost estabilizados como enmienda orgánica (Piotrowska-Cyplik et al., 2013; Sayara et al., 2010; Taiwo et al., 2016) y compostaje combinado con fitorremediación (Taiwo et al., 2016). Los porcentajes de remoción de grasas y lubricantes, fueron muy variables de acuerdo al tratamiento aplicado, alcanzando entre el 50% (Arrieta et al., 2012) y el 91% (González et al., 2012) de degradación.

En la Tabla 3.1 se hace una síntesis de las técnicas aplicadas, microorganismos utilizados y otros aspectos relevantes encontrados en estos estudios experimentales.

**Tabla 3.1.** Comparación de los estudios experimentales realizados sobre biorremediación de suelos contaminados con grasas y aceites.

Autor	Residuo	Tratamiento	Condiciones experimentales	Microorganismos utilizados	Conclusiones
Menezes et al., (2003)	Suelos contaminados con diésel obtenidos de Long Beach, California (EE.UU.) y Hong Kong (China).	Atenuación natural, bioestimulación (adición de N y P), y bioaumentación	Muestras de 450g en bandejas de aluminio con aireación constante. Incubación a temperatura ambiente (27°C) y riego semanal, durante 12 semanas. Bioestimulación: adición de 250 mg/kg de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y 100 mg/kg de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . Bioaumentación: adición de 40 mL de 2,6*10 <sup>8</sup> células/ml de un consorcio bacteriano previamente aislado del suelo de Long Beach.	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Bacillus fusiformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Acinetobacter junii</i> and <i>Pseudomonas</i> sp.	La bioaumentación en el suelo de Long Beach, mostró la mayor la tasa de degradación semanal y el mayor porcentaje de degradación de las fracciones ligeras (75%) y pesadas (73%) de hidrocarburos totales del petróleo (HTP). Entre los dos suelos, la muestra de Long Beach mostró mayor degradación en los HTP. En el suelo de Hong Kong, la atenuación natural, mostró un mayor porcentaje de degradación de las fracciones ligeras, mientras que la bioestimulación tuvo el menor efecto de degradación sobre cualquiera de los tratamientos.
Pardo et al., (2004)	Suelo de una finca ubicada en Zipaquirá, Colombia contaminado experimentalment e con petróleo crudo.	Landfarming con bioestimulación <i>in vitro</i> .	Montaje de mesocosmos con suelo contaminado con petróleo crudo tipo Castilla. Adición de fertilizante inorgánico Triple 15, el cual contiene nitrógeno amoniacal y orgánico, fósforo asimilable (P <sub>2</sub> O) y potasio soluble (K <sub>2</sub> O). 4 meses de tratamiento.	<i>Corynebacterium propinquum</i> , <i>Bacillus brevis</i> .	Los mesocosmos con nutrientes mostraron porcentajes de remoción total entre el 67% y 91%. Los controles bióticos degradaron entre el 37% y 65%.
Vargas et al., (2004)	Suelos impactados con petróleo por derrames del oleoducto Caño Limón-Coveñas, Colombia.	Landfarming con bioaumentación <i>in situ</i> .	Aislamiento y selección de bacterias degradadoras de hidrocarburos. Aplicación del consorcio seleccionado. No se especifican las condiciones fisicoquímicas.	<i>Pseudomonas</i> y bacterias lactasa positiva	El <i>landfarming</i> es una buena opción de biorremediación <i>in situ</i> , especialmente cuando se complementa con la bioaumentación con microorganismos nativos.

Vallejo et al., (2005)	Suelo de una finca ubicada en Zipaquirá, Colombia contaminado experimentalmente con petróleo crudo.	Landfarming con bioestimulación <i>in vitro</i> .	Montaje de mesocosmos con suelo contaminado con de petróleo crudo tipo Castilla. Adición de nutrientes (N y P) en forma de sales inorgánicas simples ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ y $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) y un fertilizante inorgánico compuesto (Triple 15), los días 0 y 63. Relación final de C:N:P es de 100:10:1. 125 días de tratamiento con muestreos cada 25 días.	<i>Sthenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Acinetobacter iwoffii</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Crhombacterium violaceum</i> , <i>Flavimonas oryzihabitans</i> .	La mayor degradación de TPH se evidenció durante los primeros 28 días de tratamiento. El tratamiento con sales inorgánicas simples tuvo mayor porcentaje de remoción (40%) que el fertilizante compuesto (34%), aunque no fueron significativamente diferentes del control sin nutrientes (30%).
Lee et al., (2007)	Suelo contaminado con diésel, aceites lubricantes y otros hidrocarburos ( $\text{C}_{20}\text{-C}_{40}$ ), obtenido de un taller de reparación de carros del ejército abandonado.	Bioestimulación con tres relaciones diferentes de nutrientes (C/N/P).	Microcosmos de 300g en recipientes de vidrio con capacidad de 1L, incubados a temperatura ambiente (20-25°C), humedad del 70% y adición de ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> en relación 100/10/1, 200/10/1, y 500/10/1. Aireación por volteo manual dos veces por semana. Determinación del contenido de lubricantes y la actividad microbiana cada 15 días desde el día 0 hasta el 105.	No se realizó identificación microbiana; sólo pruebas de catalasa, como indicador de la actividad de microorganismos aeróbicos y de la actividad deshidrogenasa, correlacionada con la tasa de eliminación de aceites y la respiración.	La bioestimulación es una opción viable para la remediación de aceites minerales lubricantes. Aunque la mayor actividad de degradación se estimuló con el tratamiento de menor concentración de nutrientes, no se alcanzó una degradación completa, ya que el máximo rendimiento fue de 60%. La biodegradación puede ser evaluada mediante parámetros biológicos del suelo, como respiración, actividad deshidrogenasa y catalasa. Los métodos biológicos deben complementarse con métodos químicos para mejorar la descontaminación de lubricantes.
Menéndez-Vega et al., (2007)	Subsuelo contaminado con hidrocarburos, proveniente de una antigua planta	Bioestimulación <i>in situ</i> , mediante inyección de peróxido de hidrógeno, un fertilizante	Temperatura del subsuelo: 22-26°C. Análisis previos: Extracción de hidrocarburos con diclorometano y cuantificación por cromatografía de gases.	<i>Achromobacter xylooxidans</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Microbacterium oxydans</i> , <i>Ochrobactrum</i>	La aplicación del fertilizante, el agente tensioactivo y el peróxido de hidrógeno fue exitosa para lograr la biorremediación <i>in situ</i> en un sitio contaminado con



	<p>metalmecánica del Norte de España.</p>	<p>oleófilo y un agente tensoactivo.</p>	<p>Monitoreo de microorganismos endógenos, mediante recuentos en placa, identificación morfológica y viabilidad bacteriana por técnicas microscópicas e identificación molecular con Gapped BLAST.</p> <p>Bioestimulación: Inyección de fertilizador oleofílico S200 ajustado a una relación C: N de 10:1.</p> <p>Aplicación de una dilución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250mg/L) de acuerdo a la demanda estequiométrica de oxígeno de los contaminantes.</p> <p>Infiltración de Bioversal HC, como agente de lavado de hidrocarburos absorbidos en las zonas no saturadas.</p>	<p><i>anthropi,</i> y <i>Pseudomonas putida.</i></p>	<p>hidrocarburos, ya que mejoran la biodisponibilidad de los contaminantes y el nivel de oxígeno disuelto.</p> <p>Los análisis químicos confirmaron la desaparición de los contaminantes y por lo tanto la eficacia del tratamiento, sobre todo durante los dos primeros meses de tratamiento.</p> <p>Se necesitan estudios moleculares para entender completamente el comportamiento de las comunidades microbianas durante la biorremediación en ambientes contaminados.</p>
<p>Sayara et al., (2010)</p>	<p>El suelo utilizado en este estudio se recogió de una explotación agrícola libre de cualquier PHA en Tarragona, España, al cual se le añade una mezcla de PHA similar a la creosota (30% fluoreno, 29% fenantreno, 9% antraceno, 20% fluoranteno, 3,5% pireno y 8,5% 57enzo-antraceno). Esta mezcla se añadió</p>	<p>Compostaje llevado a cabo en condiciones de laboratorio.</p>	<p>Muestras de 3,5 kg, producto de la mezcla manual del suelo contaminado y la enmienda orgánica (1:1) y luego con un agente de volumen (astillas de madera y residuos de poda), en relación 1:1, en vasos Dewar de 4,5 L. Adición de agua para asegurar humedad del 50-60%. Incubación durante 30 días.</p> <p>Enmienda orgánica: Cinco tipos de compost derivados de la fracción orgánica de los residuos municipales, cuya principal diferencia es el grado de estabilidad, que va desde totalmente inestable a abono estable.</p>	<p>No se realizaron pruebas de identificación y cuantificación microbiológica.</p>	<p>A pesar de que los compost más estables pueden promover la degradación rápida de los PHA, el compost menos estable no es adecuado para este tipo de remediación.</p> <p>La materia húmica aceleró más la tasa de degradación, que las altas temperaturas, ya que facilita la desorción de los contaminantes y aumenta la biodisponibilidad para la actividad microbiana.</p> <p>La concentración de PHA afecta el proceso, ya que si es muy baja, se puede disminuir la biodisponibilidad y por lo tanto, disminuir la tasa de degradación.</p>

	al suelo en concentraciones de 0,1-2 g/kg.				
Vásquez et al., (2010)	Lodos aceitosos provenientes de lavaderos de carros, lodos de sistemas de alcantarillado de zonas industriales de la ciudad de Bucaramanga, y lodos estabilizados del tratamiento de aguas residuales domésticas.	Biopilas en campo con bioaumentación y bioestimulación.	Aislamiento e identificación de microorganismos para preparar el inóculo. Biopilas construidas con una inclinación de 15°, un área de 1 m <sup>2</sup> con un peso de 50 kg y polisombra para la protección contra los rayos solares. Remojo constante, volteo manual y adición de NPK los días 8,16 y 24. Grupo 1: Aplicación de inóculo los días 1, 10, 20 y 30. Tiempo total: 40 días. Grupo 2: Aplicación de inóculo los días 1, 30, 60 y 90. Tiempo total: 120 días	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>Citrobacter sp.</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i>	Se aislaron 22 microorganismos de importancia en procesos de biorremediación, dentro de los que se encuentran bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos. Se lograron porcentajes de remoción de TPH entre el 74,03% y 87,09% en 40 días y 87,94 y 95% en 120 días con la aplicación de los consorcios microbianos obtenidos. El uso de la bioaumentación con microorganismos nativos representa una alternativa para reducir la contaminación generada por residuos peligrosos y recuperación de zonas impactadas.
Sprocati et al., 2011	Suelo recogido en marzo de 2008 de un campo abandonado situado en Piana di Monte Verna (Nápoles, Italia). Se dispersaron soluciones de Zn y Pb como ZnSO <sub>4</sub> como Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> de manera uniforme hasta alcanzar una concentración final de 1000mg Zn/kg y	Bioaumentación a nivel de laboratorio.	Montaje de microcosmos: 1. Suelo con inóculo bacteriano. 2. Suelo con diésel y metales pesados. 3. Suelo con diésel e inóculo bacteriano. 4. Suelo con diésel, metales pesados e inóculo bacteriano. La bioaumentación se realizó 3 días después de la contaminación, añadiendo 12mL de medio mineral a una concentración de 5×10 <sup>8</sup> UFC/mL.	Inóculo alóctono: <i>Delftia tsuruhatensis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas resinovorans</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Exiguobacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas jessenii</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Paenibacillus polymixa</i> .	La introducción de un inóculo microbiano con capacidad degradadora de hidrocarburos previamente comprobada, como agente de bioaumentación fue capaz de promover la biodegradación de hidrocarburos cerca de 75% en el suelo, sin perturbar la comunidad microbiana nativa.

	500 mg Pb/kg en la capa superior del suelo; después de 15 días, se vertieron 30g de aceite diésel para simular una contaminación accidental (1%).				
Thangarajan et al., (2011)	Pila de suelo del Depósito de Residuos del Sur, Adelaida, Australia del Sur, formada por la mezcla de suelos contaminados con hidrocarburos (aceites de motor, lodos, residuos de diésel y petróleo crudo) que estuvo sujeta a atenuación natural durante dos años.	Atenuación natural, bioestimulación, bioaumentación y bioestimulación combinada con bioaumentación .	Microcosmos de suelos en frascos de 1L. Atenuación natural: 200g de suelo sin modificaciones. Bioaumentación: Adición del cultivo de hongos (0,4mg/g de suelo). Bioestimulación: Adición de solución nutritiva estéril (25%). Bioestimulación combinada con bioaumentación: Adición de hongos y solución nutritiva estéril en las mismas concentraciones. Contenido de agua al 50% con riego constante para mantener la humedad. Cubrimiento con papel aluminio perforado, e incubación a 30 °C durante 56 días. Muestreo y mezclado, para asegurar la aireación, semanal.	<i>Rhodococcus</i> sp., <i>Scedosporium apiospermum</i>	La tasa de degradación de HTP en todas las muestras fue rápida del día 0 al día 21 (>50%). Sin embargo, este proceso puede ser afectado negativamente por la disminución de la biodisponibilidad de HTP. No se observaron diferencias significativas en los tratamientos luego del séptimo día, lo que insinúa que la bioestimulación y la bioaumentación tienen pocos efectos a largo plazo y que la aireación y el riego son suficientes para la degradación de HTP por atenuación natural.
Arrieta et al., (2012)	Suelo extraído de los predios de la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía de la	Atenuación natural y bioestimulación a escala de laboratorio.	Bandejas con 2 kg de suelo base seca, mantenidas a temperatura ambiente durante 4 semanas. Bioestimulación: Adición de fósforo como Na <sub>5</sub> P <sub>3</sub> O <sub>10</sub> y nitrógeno como urea al 46%, grado agroquímico.	<i>Enterobacter</i> sp, <i>Bacillus</i> sp, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Sanguibacter soli</i> , <i>Arthrobacter</i> sp y <i>Flavobacterium</i>	Se alcanzó una reducción significativa al final del experimento en las concentraciones de los HTP. El tratamiento de bioestimulación presentó un 50,99% de remoción, mientras que el

	Sede Medellín (Colombia), entre 0,25m y 1,00m de profundidad, contaminado artificialmente con diésel (40.000 ppm).			sp.	tratamiento de atenuación natural alcanzó un 36,86% de remoción respecto a la concentración inicial.
González et al., (2012)	Residuo graso industrial suministrado por una empresa procesadora de cerdos, ubicada en Valencia, Estado Carabobo, Venezuela.	Bioaugmentación de la flora bacteriana endógena.	Caracterización e identificación bioquímica de bacterias endógenas, utilizando un medio mínimo mineral suplementado con el Residuo Graso Industrial (RGI) para su aislamiento. Inóculo bacteriano: constituido por una mezcla en volúmenes iguales de las cepas aisladas. Biotratamiento: Mezcla del consorcio, el residuo graso y medio mínimo mineral en relación 5:1:5; incubación a temperatura ambiente (20-24°C) durante 21 días.	<i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> y <i>Bacillus</i>	Se aislaron 5 cepas bacterianas, que por las pruebas bioquímicas y API, se identificaron como pertenecientes a los géneros <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> y <i>Bacillus</i> . El consorcio bacteriano degradó el 91,4% del contenido graso del residuo; disminuyendo en un 33,6% la DBO <sub>5</sub> , y un 59,8% la DQO, en 21 días de tratamiento. Aunque las cepas de <i>Bacillus</i> presentaron la mayor actividad lipolítica, no existieron diferencias notables en sus actividades enzimáticas.
Lladó et al.,(2012)	Suelos contaminados con aceite de corte, tomados de una ex fábrica de tornillos en la ciudad de Barcelona (España), que fue abandonada en 1990.	Atenuación natural, bioestimulación (con nutrientes inorgánicos, con sustrato fácilmente biodegradable y con biosurfactante) y bioaugmentación	Microcosmos con 60 g de suelo. Durante 100 días se mantiene la humedad del suelo al 60% y se airea por medio de mezcla mecánica con una varilla de vidrio dos veces a la semana. Luego, se somete durante 180 días a los siguientes tratamientos. 1. Tratamiento básico: Igual que los primeros 100 días. 2. Bioestimulación con nutrientes inorgánicos: adición de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> y	<i>Bacillus selenatarsenatis</i> , <i>Dietzia maris</i> , <i>Arthrobacter sulfonivorans</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp.  Inóculo fúngico: <i>Trametes versicolor</i>	La adición de nutrientes y consorcios bacterianos no muestran mejoras significativas frente a la degradación de hidrocarburos conseguida a partir del mantenimiento de la humedad óptima y la aireación constante, mientras que la introducción de un hongo ligninolítico, si se muestra como una estrategia eficaz de remediación, ya que logra

		(con consorcio bacteriano y con inóculo fúngico).	<p><math>K_2HPO_4</math> durante los primeros 30 días para obtener una relación C:N:P equivalente a 300:10:1.</p> <p>3. Bioestimulación con sustrato fácilmente biodegradable: adición de nutrientes y glucosa al 2%.</p> <p>4. Bioestimulación con biosurfactante: Adición de nutrientes y el biosurfactante MAT10 en dos concentraciones diferentes.</p> <p>5. Bioaumentación con inóculo bacteriano: adición de nutrientes y un consorcio bacteriano en una concentración de 108 microorganismos/g de suelo. El inóculo se ha mantenido usando diésel como única fuente de carbono y de energía durante 10 años.</p> <p>6. Bioaumentación con inóculo fúngico: Adición de nutrientes y la cepa ligninolítica <i>Trametes versicolor</i>.</p>		<p>aumentar la degradación. El inóculo fúngico produce un aumento y cambio significativo en la biodiversidad detectable de la comunidad bacteriana autóctona ya que promueve el establecimiento de comunidades microbianas degradadoras de HTP.</p> <p>Es necesario, combinar las pruebas de degradación microbiana, con la evaluación de toxicidad y genotoxicidad para dar más claridad a estos procesos de biorremediación de suelos contaminados industrialmente.</p>
Piotrowska-Cyplik et al., (2013)	Tierra de blanqueo engrasada, obtenida del mayor procesador de oleaginosas y fabricante de grasas vegetales en Polonia, con un contenido de 55% de grasas y lodos de depuradora deshidratados de	Compostaje en biorreactor de dos cámaras (125 dm <sup>3</sup> c/u).	<p>Biorreactor A: Mezcla de 8,75 kg de tierra de blanqueo engrasada (19%), 35 kg de lodos deshidratados de depuradora (77%) y 1,6 kg de paja de maíz (4%).</p> <p>Biorreactor B: Mezcla de 43 kg de lodos de depuradora (96%) y 1,6 kg de paja de maíz (4%).</p> <p>Muestreo en los días 0, 5, 14, 22, 32, 40 y 44.</p>	No se realizaron aislamientos ni caracterización de las comunidades de microorganismos presentes durante el proceso de compostaje.	<p>El residuo graso tratado con compostaje, sufrió la biodegradación más rápida en la fase termófila del proceso. Las actividades de las enzimas fueron más altas en la fase termófila. Como resultado del proceso de compostaje, se eliminó la fitotoxicidad inicial de los residuos tratados, por lo cual, ninguno de los compost maduros muestran efectos fitotóxicos ni mutagénicos.</p>

	una Planta de Tratamiento de Residuos Municipales de Polonia.				
Agnello et al., (2015)	Suelo obtenido de una zona urbana cerca de una estación de combustible con antecedentes de contaminación por metales pesados e hidrocarburos de petróleo, principalmente diésel.	Atenuación natural, fitorremediación, bioaumentación y fitorremediación asistida con bioaumentación	La fitorremediación se realizó con alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.), las plantas se cosecharon después de 30, 60 y 90 días del crecimiento en el suelo co-contaminado. La bioaumentación con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , cada 15 días, con el objetivo de mantener un número elevado de microorganismos durante todo el experimento.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	El tratamiento de bioaumentación asistida por fitorremediación presentó el grado más alto de eliminación de HTP, seguido por la bioaumentación, la fitorremediación y la atenuación natural. Las asociaciones planta-bacteria y, en particular, alfalfa - <i>P. aeruginosa</i> podrían ser un enfoque adecuado para reducir el tiempo de degradación, sin embargo, deben estudiarse bajo condiciones <i>in vivo</i> .
Taiwo et al., (2016)	Suelo tomado de tres zonas industriales en el estado de Ogun y una mina de oro en Iperindo, Osun, que se mezcló con un compost orgánico maduro de doce semanas, hecho a partir de estiércol de vaca, jacinto de agua y aserrín.	Compostaje asistido por fitorremediación.	La mezcla compost/suelo se hizo en cinco relaciones diferentes (1:1, 1:2, 1:3, 1:4 y 1:5) y se plantaron las semillas de Kenaf ( <i>Hibiscus cannabinus</i> ), con una duración del experimento de cuatro semanas.	No se estudiaron las comunidades microbianas presentes durante el proceso.	Al final del tratamiento, el compost presentó una relación C/N idónea para el cultivo agrícola. El compost fue eficaz en la eliminación de metales de los suelos contaminados. Los parámetros de crecimiento de <i>H. cannabinus</i> (Kenaf), como la longitud y amplitud de la hoja y la altura del tallo, mostraron incrementos desde la semana 1 a la semana 4 después de la siembra.

Fuente: Elaboración propia

## **3.2 Aspectos claves en la biorremediación de residuos contaminados con grasas y lubricantes**

### **3.2.1 Características fisicoquímicas tenidas en cuenta a nivel experimental**

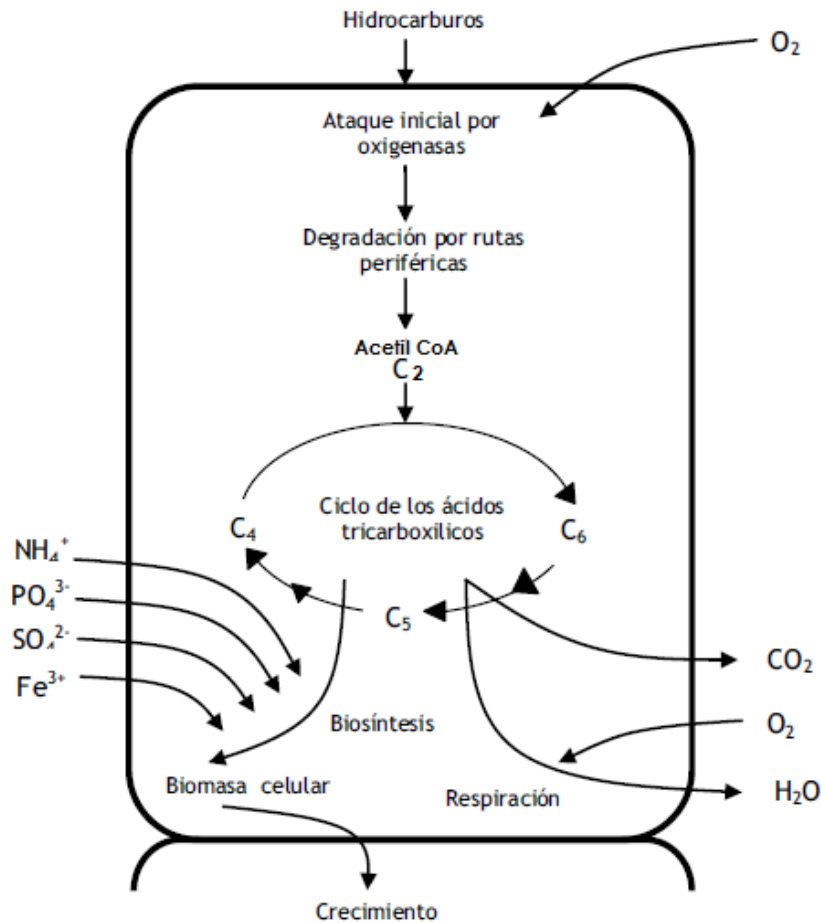
A pesar de la variedad de tratamientos reportados para la biorremediación de residuos contaminados con grasas y lubricantes (atenuación natural, bioestimulación, bioaumentación, compostaje, *landfarming*, biopilas, entre otros), existen condiciones físico-químicas generales que deben ser controladas en dichos procesos, tales como la aireación, la temperatura, el contenido de humedad, la relación de nutrientes y el pH (Abarataldea, 2005; Arrieta et al., 2012; Lee et al., 2007; Lladó et al., 2012; Thangarajan et al., 2011; Vallejo et al., 2005).

#### **3.2.1.1 Aireación**

Generalmente, la biorremediación aerobia de contaminantes orgánicos es más rápida que la biorremediación en forma anaerobia (Izquierdo, 2013; Lladó, 2012; Thangarajan et al., 2011; Vargas et al., 2004;), ya que la aireación facilita la migración de la fase volátil de los contaminantes y, siendo el oxígeno, el aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones de las células, se libera una mayor cantidad de energía que estimula el crecimiento de la biomasa, logrando un aumento en el consumo del sustrato (contaminantes hidrocarbonados) (Gómez et al. 2008; Realp et al., 2008; Thangarajan et al., 2011).

Además, en el metabolismo microbiano de degradación aeróbica de hidrocarburos, el oxígeno, es un reactivo indispensable en el mecanismo de activación de las oxigenasas (monooxigenasas para hidrocarburos alifáticos o dioxigenasas para hidrocarburos aromáticos). Como se observa en la Figura 3.3., los átomos de oxígeno, se incorporan directamente al contaminante para promover la degradación gradual de la molécula mediante rutas de oxidación periféricas que dan lugar al Acetil-CoA necesario para activar el ciclo de los ácidos tricarbónicos que produce finalmente los productos estabilizados (Izquierdo, 2013; Lladó, 2012; Pardo et al., 2004; Widdel & Rabus, 2001).

De modo que es primordial la oxigenación constante de los sistemas de tratamiento mediante el volteo del material o empleando compresores y/o sopladores (Agnello et al., 2015; Arrieta et al., 2012; González et al., 2012; Lee et al., 2007; Menéndez-Vega, 2007; Menezes et al., 2003; Sprocati et al., 2011; Thangarajan et al., 2011; Vásquez et al., 2010).



**Figura 3.3.** Ruta básica de degradación microbiana aerobia de los hidrocarburos.

### 3.2.1.2 pH

La mayoría de bacterias heterótrofas se desarrollan óptimamente en pH cercanos a la neutralidad (Pardo et al., 2004). Algunos estudios han establecido que el rango óptimo de pH para la biodegradación de lodos aceitosos en suelo se encuentra entre 5,5 y 8,0 (Lee et al., 2007; Lladó et al., 2012; Menéndez-Vega et al., 2007; Pardo et al., 2004; Taiwo et al., 2016; Vallejo et al, 2005), con disminuciones notables luego de los tratamientos, debido a la transformación de los materiales orgánicos y procesos de nitrificación, lo cual contribuye a que el suelo sea más ácido (Gómez et al., 2008; Taiwo et al., 2016; Vallejo et al, 2005). En tratamientos de compostaje, el valor óptimo inicial está entre 6,5 y 8,0, y presenta fluctuaciones durante el proceso de acuerdo a la sucesión de microorganismos y los subproductos que éstos generan (Negro, 2000).



### **3.2.1.3 Temperatura**

De acuerdo a Pardo et al., (2004) la temperatura, además de influenciar la presencia y actividad microbiana durante los tratamientos de biodegradación, ejerce una gran influencia sobre la naturaleza física y química de las grasas y aceites. Cuando la temperatura es baja, la viscosidad de los aceites aumenta variando su solubilidad en agua y disminuyendo la volatilización de algunas fracciones tóxicas que pueden afectar la actividad degradadora de los microorganismos, mientras que a temperaturas muy altas, se incrementa la toxicidad de los hidrocarburos inhibiendo la actividad microbiana. Como se puede comprobar en los estudios realizados por Agnello et al., (2015); Arrieta et al., (2012); González et al., (2012); Lee et al., (2007); Lladó, (2012); Piotrowska-Cyplik et al., (2013); Taiwo et al., (2016); Thangarajan et al., (2011); Vallejo et al., (2005) y Vásquez et al., (2010) entre otros, el rango de temperatura más apropiado para la biorremediación se presenta en el rango mesofílico (20°C-40°C), a la que se intensifica la actividad enzimática de los microorganismos acelerando al máximo los procesos de biodegradación.

### **3.2.1.4 Relación Carbono/Nitrógeno/Fósforo (C/N/P)**

La disponibilidad de nitrógeno y fósforo en el medio es un factor limitante en la degradación microbiana de hidrocarburos, por lo cual se debe ajustar la relación C/N/P mediante la adición al medio de Sales Inorgánicas Simples (SIS) o Fertilizantes Inorgánicos Complejos (FIC) que permitan acelerar el proceso de biodegradación (Gómez et al., 2008; Lladó et al., 2012; Pardo et al., 2004; Taiwo et al., 2016). La relación C/N/P más utilizada en los procesos de bioestimulación es de 100/10/1, con la cual se reportan porcentajes de degradación entre 40-50% (Menéndez-Vega et al., 2007; Menezes et al., 2003; Vallejo et al., 2005), aunque en el estudio de Lee et al., (2007) se obtuvo una mayor actividad de degradación (60%) utilizando una relación de 500/10/1.

### **3.2.1.5 Humedad**

Debido a que los microorganismos requieren agua para cumplir con sus necesidades fisiológicas, la biodegradación de hidrocarburos en ecosistemas terrestres puede ser limitada por la cantidad de agua disponible en el medio para su crecimiento y metabolismo (Gómez et al., 2008; Negro, 2000). Los estudios analizados reportan que las tasas óptimas de biodegradación se dan cuando la saturación de agua en el suelo se encuentra en el rango de 30% a 70% (Lee et al., 2007; Lladó, 2012; Pardo et al., 2004; Piotrowska-Cyplik et al., 2013; Thangarajan et al., 2011; Vásquez et al., 2010).

### **3.2.2 Aislamiento de microorganismos**

Tal como afirman Menendez-Vega et al. (2007), antes de aplicar protocolos de biorremediación, es importante establecer el potencial degradador de los microorganismos endógenos para aprovechar sus características y evaluar los factores limitantes a controlar durante el tratamiento.

Para el aislamiento de los microorganismos con capacidad degradadora de hidrocarburos, algunos autores proponen hacer un enriquecimiento previo en medios de cultivo ricos en nutrientes que estimulen su crecimiento en condiciones de laboratorio (Arrieta et al., 2012; González et al., 2012; Menéndez-Vega, 2007; Thangarajan et al., 2011; Vásquez et al., 2010). Estos medios pueden ser caldos mínimos minerales de composición definida de sales (González et al., 2012; Narváez-Flórez et al., 2008; Vásquez et al., 2010), o medios nutritivos comerciales como Caldo Nutritivo, formado por pluripectona y extracto de carne; BD Tryptic Soy Broth, medio de digerido de soja y caseína, o caldo Luria Bertani LB (caldo LB) con peptona de caseína y extracto de levadura; que se suplementan con pequeñas cantidades del residuo a tratar (1% a 10%) para proporcionar al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de los microorganismos degradadores (Arrieta et al., 2012; Menéndez-Vega, 2007; Thangarajan et al., 2011). Luego de este pre-enriquecimiento, se toma una muestra y se siembra por agotamiento en medio selectivo Bushnell Hass Sales Minerales (BHMS) que es el recomendado para estudios de degradación microbiana de hidrocarburos, ya que contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos, excepto la fuente de carbono que se complementa con el residuo a analizar (Arrieta et al., 2012; Thangarajan et al., 2011), o en Agar Cetrimide, que es especial para el aislamiento de *Pseudomonas*, por el gran reconocimiento de este género como biodegradador (Rodríguez et al., 2015; Sprocati et al., 2011). La temperatura de incubación oscila entre los 24°C y los 30°C, pues se buscan los microorganismos con metabolismo activo en las condiciones que se va a aplicar el tratamiento posteriormente.

### **3.2.3 Microorganismos relevantes**

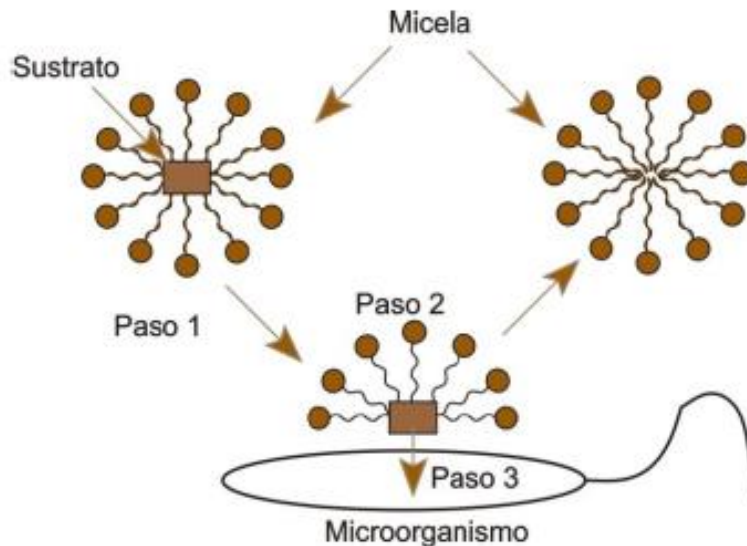
Las comunidades microbianas con capacidad enzimática para metabolizar los compuestos contaminantes generalmente están conformadas por bacterias, pero también algunos hongos y levaduras intervienen en el proceso (Das & Dash, 2014; Mehta et al., 2014).

Los estudios sobre la biodegradación de suelos contaminados con aceites y residuos grasos, demuestran que los principales géneros de bacterias que utilizan estos contaminantes como fuente de carbono y energía, son: *Acinetobacter*,

*Achromobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Corynebacteria*, *Delftia*, *Flavobacterium*, *Marinococcus*, *Methylobacterium*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Planococcus*, *Pseudomonas*, y, *Rhodococcus* (Agnello et al., 2015; Astashkina et al., 2015; Lladó et al., 2012; Rodríguez et al., 2015; Sprocati et al., 2011). Además se ha indicado que varias de estas especies poseen diferentes genes catabólicos homólogos a genes alcano-monooxigenasa que codifican enzimas que participan en la mineralización de hidrocarburos, entre los que se incluyen: alcano monooxigenasa (*alkB*) a partir de *Pseudomonas putida*; alcano monooxigenasa (*alkM*) a partir de *Acinetobacter* sp., cepa ADP-1; *alkB1*, *alkB2*, alcano monooxigenasa de *Rhodococcus* sp.; *xylE*, catecol-2,3-dioxigenasa de *P. putida*; naftaleno dioxigenasa (*ndoB*) por *P. putida*; y *nidA*, pireno dioxigenasa subunidad grande de *Mycobacterium* sp., cepa PYR-1; y, por lo tanto, tienen la posibilidad de producir proteínas con alcano-monooxigenasas funcionales (Das et al., 2015; Wang et al., 2013).

Otro mecanismo que tiene incidencia directa en los procesos de biorremediación, es la síntesis de agentes extracelulares biotensoactivos (glicolípidos, lipopolipéptidos y complejos proteína – lipopolisacárido), por parte de numerosos representantes bacterianos y fúngicos tales como *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Candida*, y, *Torulopsis* (Petrikov et al., 2013; Thavasi et al., 2011); ya que estas sustancias anfifílicas, es decir, que presentan una cabeza polar hidrofílica, formada por mono, oligo o polisacáridos, péptidos o proteínas, y una cola apolar hidrofóbica que por lo general contiene ácidos grasos o alcoholes grasos (Izquierdo, 2013), aumentan el área superficial y la biodisponibilidad de las sustancias hidrófobas a las células microbianas y facilitan la fijación de los microorganismos sobre el sustrato a degradar, mediante la formación de emulsiones (Pacwa-Ptocińczak et al., 2011). Este proceso se puede esquematizar en tres etapas como se muestra en la Figura 3.4; la primera, es el transporte de la micela solubilizada con el sustrato, la segunda, es el intercambio de las moléculas del surfactante (micelas) con la célula (proceso para la degradación) y la tercera, es la transferencia del sustrato a la célula microbiana.

Unos de los biosurfactantes más estudiados son los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas* sp., y los trehalolípidos producidos por *Mycobacterium tuberculosis*, *Rhodococcus erythropolis*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Gordonia* y *Corynebacterium* (Izquierdo, 2013; Jiménez et al., 2010; Souza et al., 2014).



**Figura 3.4.** Transferencia de masa de micelas a la célula bacteriana.

De acuerdo a la información expuesta, se puede inferir que el género bacteriano *Pseudomonas* es de los más relevantes y promisorios en los procesos de biorremediación, ya que posee múltiples vías metabólicas que favorecen la degradación de sustancias tóxicas; por esta razón, se utilizará como modelo para profundizar más en el estudio de dichas rutas y el genoma que le confieren estas facultades.

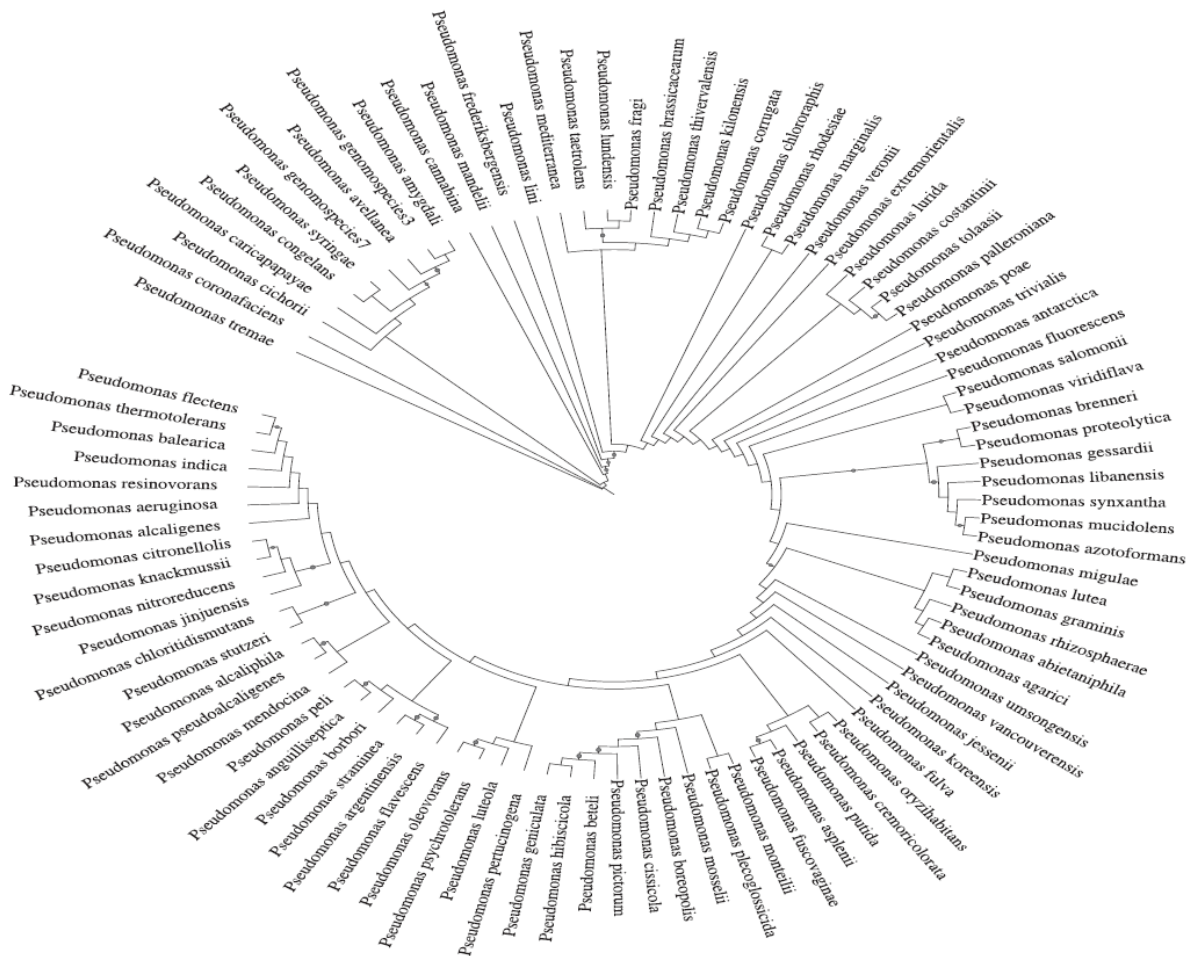
### 3.2.3.1 *Pseudomonas* sp.

El género *Pseudomonas* fue descrito por primera vez por Migula en 1894, basado en características fenotípicas generales (bastones Gram negativos, aeróbicos no esporulados, flagelados) que no permitían una diferenciación de otras bacterias Gram negativas (Cornelis, 2008; Peix et al., 2009).

Éste género ha tenido una gran variación en su clasificación taxonómica a lo largo de los años; en la actualidad, está clasificado en el dominio *Bacteria*, phylum *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pseudomonadales* y familia *Pseudomonaceae* (Slabbinck et al., 2010) y, a pesar de que las secuencias del gen *rpoB* permiten una mayor diferenciación de especies estrechamente relacionadas, como las del género *Pseudomonas* (Bou et al., 2011), aún se necesitan más datos de la hibridación DNA-DNA (DDH) y la realización de extensos análisis fenotípicos para validar los agrupamientos (Peix et al., 2009; Slabbinck et al., 2010). En consecuencia, en marzo del 2008 se publicaron 95

especies válidas pertenecientes al género, de acuerdo a la secuenciación del gen 16S rRNA, las cuales se pueden observar en el árbol filogenético mostrado en la Figura 3.5 (Slabbinck et al., 2010).

Fuente: Slabbinck et al., 2010.



**Figura 3.5.** Árbol filogenético de máxima similitud de género *Pseudomonas* basado en la secuencia del gen 16S rRNA. El árbol filogenético se elaboró mediante el algoritmo de máxima similitud en el software RAXML y es visualizado con la herramienta de la web iTOL (Slabbinck et al., 2010.). El software RAXML es un programa para la Máxima Verosimilitud secuencial y paralela basada en la probabilidad de grandes árboles filogenéticos (Stamatakis, A., 2014).

Los miembros del género *Pseudomonas* son bastones rectos o ligeramente curvados con flagelos polares, de respiración aeróbica, no fermentativos<sup>12</sup> y han demostrado una gran ubicuidad, ya que se han aislado de todo tipo de entornos alrededor del mundo, desde la Antártida hasta los Trópicos en aguas, suelos, tejidos vegetales y animales (Peix et al., 2009). Aunque algunas de sus especies son patógenos oportunistas de plantas, animales y humanos (Stover et al., 2000), este género bacteriano es de gran importancia en los procesos de tratamiento de suelos y aguas residuales debido a su alta capacidad de biodegradación de muchos compuestos orgánicos (Yong et al, 2014).

La especie tipo del género es *Pseudomonas aeruginosa*, la cual fue descubierta originalmente por Schroeter en 1872 (Slabbinck et al., 2010) y su genoma completo (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1) fue presentado desde el año 2000 por Stover et al. Sin embargo, apenas en el 2015, Das et al., realizaron un análisis profundo del genoma de *P. aeruginosa* cepa N002, respecto a los factores genéticos asociados con la adaptación a ambientes contaminados con hidrocarburos. Para esto, secuenciaron el genoma de la cepa N002 de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de un suelo contaminado con petróleo de Assam, India, obteniendo las características que se resumen en la Tabla 3.2 y la representación gráfica del cromosoma que se observa en la Figura 3.6. En esta figura, también se puede observar la clasificación de los 5629 genes codificantes de proteínas de acuerdo a la función que cumplen, en la cual se le asignaron 347 genes a la categoría de transducción de señales y 74 genes a la categoría de sistema de dos componentes, aspectos de gran relevancia en la regulación del metabolismo celular y la adaptación a las diferentes condiciones del entorno.

**Tabla 3.2.** Características generales del cromosoma de *P.aeruginosa*

COMPONENTE DEL CROMOSOMA	CANTIDAD
Tamaño total (pb)	6.537.648
Total bases codificantes DNA	5.491.038
Contenido G+C (%)	62,36
Número total de genes	5.764
Genes codificantes de proteínas (CDS)	5.629
Genes RNA	135
Genes rRNA	12
5S rRNA	4
16S rRNA	4
23S rRNA	4
Genes tRNA	63
Número de ORF	11.038

<sup>12</sup> Su metabolismo siempre es respiratorio, aunque la mayoría de las especies utiliza como aceptor final de electrones al oxígeno, algunas usan otras moléculas inorgánicas (NO<sup>-</sup>).

Fuente: Das et al., 2015.

También, analizaron las regiones del cromosoma con probabilidad de poseer genes de transferencia horizontal, conocidas como Islas Genómicas (GI), ya que la transferencia de material genético entre bacterias, les permite adquirir funciones que facilitan su adaptación a distintos entornos, entre ellas, la capacidad de degradar sustancias tóxicas, la resistencia a los antibióticos y la producción de metabolitos secundarios, para así generar tratamientos de biorremediación más eficientes (Rozo & Dussan, 2010).

Con este análisis, Das et al. (2015), encontraron 40 Islas Genómicas que comprenden 537 genes en total, lo cual equivale al 30,3% del cromosoma. Uno de estos genes, corresponde al gen de la alcano 1-monooxigenasa (*AlkB*, A222\_02440) que se encuentra en la región del núcleo del genoma y es homólogo al gen *AlkB* de *Pseudomonas putida* GPO1, que es la primera enzima involucrada en la oxidación de hidrocarburos alifáticos, y es una de las mejor caracterizadas, por lo cual se utilizará como modelo para explicar la ruta de degradación.

Fuente: Das et al., 2015.

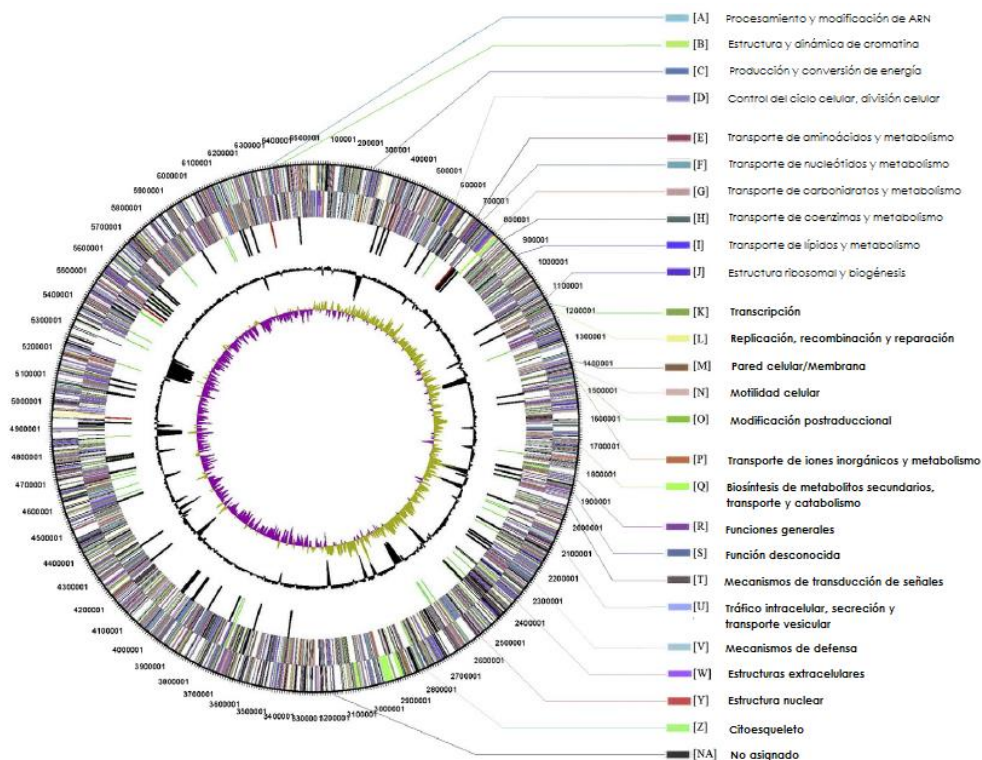
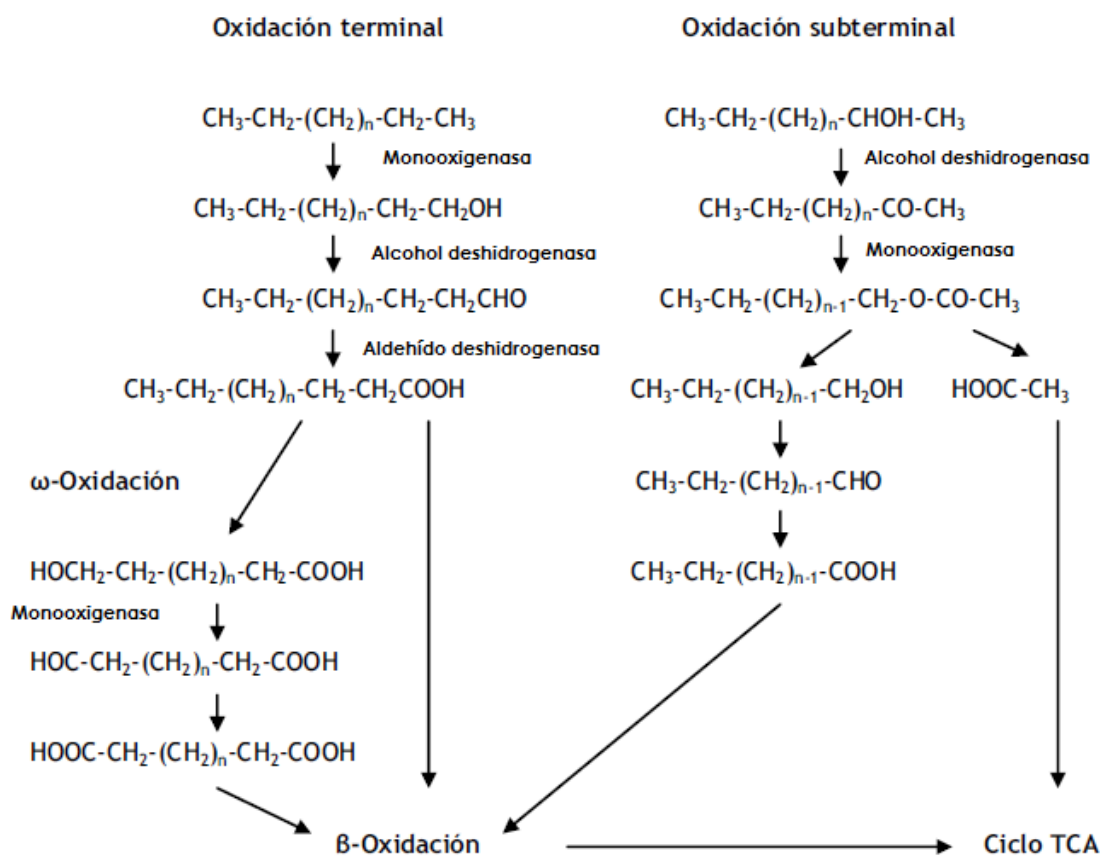


Figura 3.6. Mapa del cromosoma circular de *Pseudomonas aeruginosa* N002.

Como se dijo previamente, la degradación de hidrocarburos alifáticos inicia con la monooxigenación de la cadena hidrocarbonada, que de acuerdo a la posición en que se produce, da lugar a las tres rutas metabólicas que se muestran en la Figura 3.7: la oxidación terminal, la oxidación subterminal y la  $\omega$ -Oxidación, siendo la primera la más común (Lladó, 2012). Los productos hidroxilados obtenidos mediante estas rutas de degradación, son conducidos a la ruta de la  $\beta$ -oxidación, en la cual se forma el Acetil-CoA necesario para activar el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y promover la degradación final hasta biomasa, agua y dióxido de carbono (Izquierdo, 2013; Lladó, 2012; Pardo et al., 2004; Widdel & Rabus, 2001).

Fuente: Izquierdo, 2013.



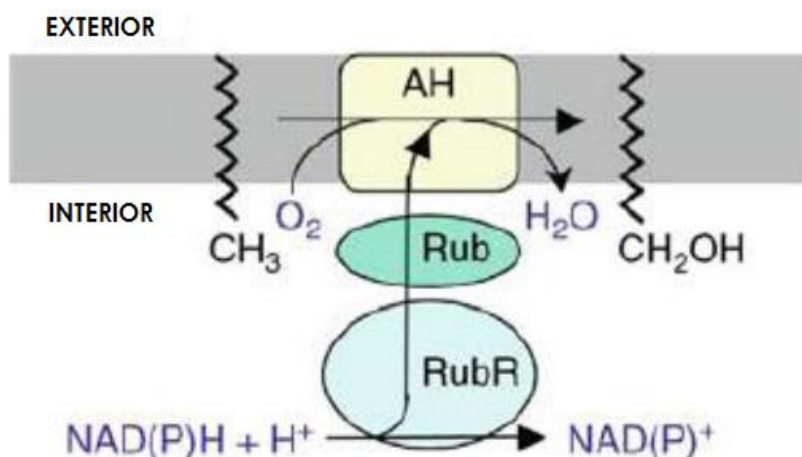
**Figura 3.7.** Rutas de degradación microbiana de n-alcenos

AlkB, es una monooxigenasa integral de membrana de dihierro no hemínico, que hidroxila alcanos en la posición terminal y requiere dos proteínas de transferencia de electrones solubles llamadas rubredoxina (AlkG) y rubredoxina reductasa (AlkT). Rubredoxina reductasa, a través de su cofactor FAD, transfiere electrones de NAD(P)H a la rubredoxina, que a su vez transfiere los electrones a AlkB, como se muestra en la Figura 3.8 (Di Martino, 2015).



De esta forma, uno de los átomos de oxígeno, es transferido al grupo metilo terminal del alcano, convirtiéndolo en alcohol, mientras que el otro es reducido a agua por los electrones transferidos por la rubredoxina (Izquierdo, 2013). A continuación, la enzima alcohol deshidrogenasa produce un aldehído que es convertido a ácido graso por acción de una aldehído deshidrogenasa, y éste mediante la ruta de la  $\beta$ - oxidación, produce las moléculas de Acetil-CoA que ingresan al metabolismo central.

Fuente: Di Martino, 2015.



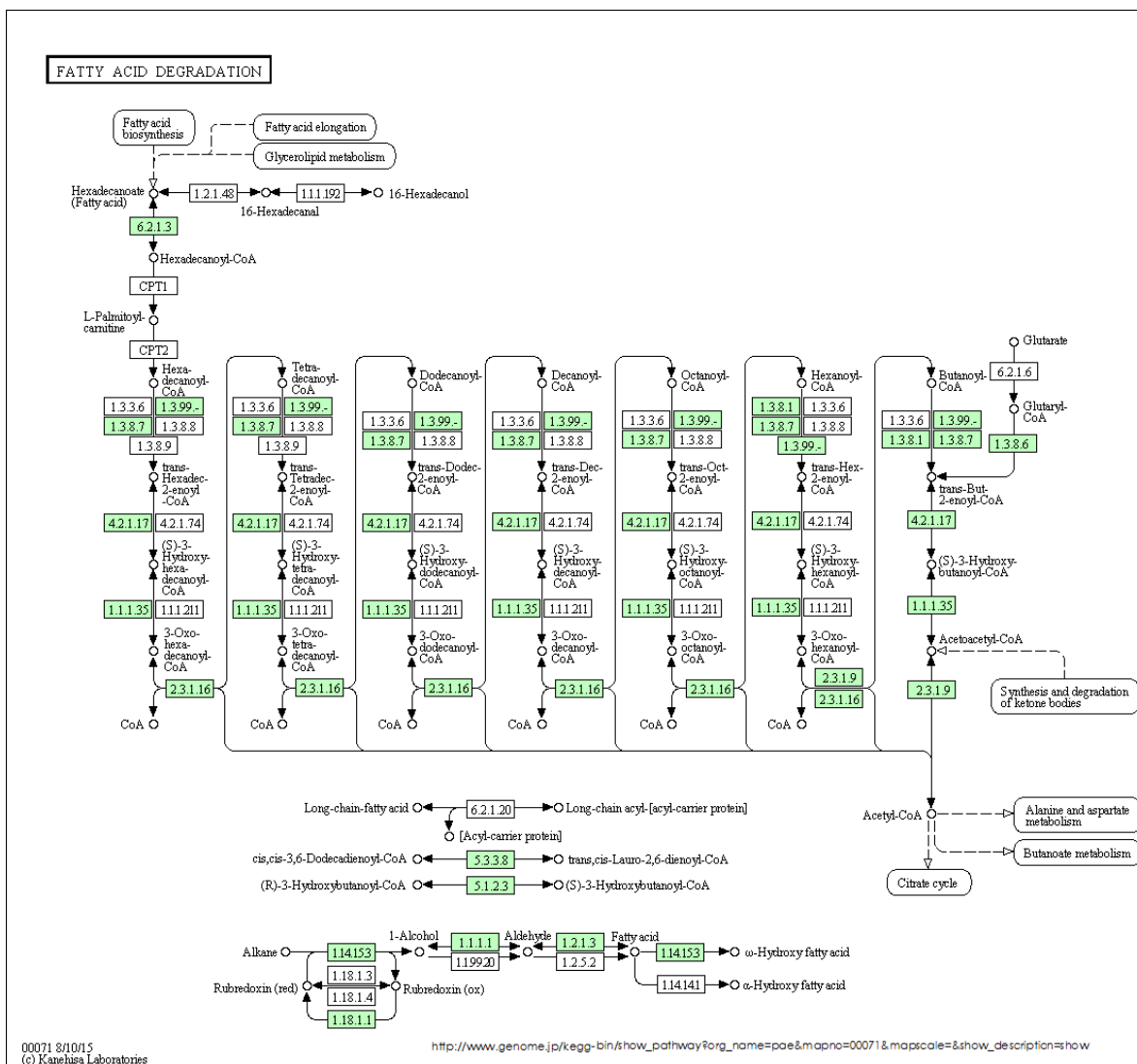
**Figura 3.8.** Oxidación de n-alcanos por alcano hidroxilasas pertenecientes a la familia AlkB.

En la Figura 3.9, se resaltan las enzimas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, que participan en la  $\beta$ - Oxidación y en la tabla 3.3 se decodifica el nombre de la enzima correspondiente.

**Tabla 3.3.** Codificación de las enzimas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* que participan en la  $\beta$ - Oxidación de los ácidos grasos.

CÓDIGO	ENZIMA
1.14.15.3	Alcano 1-monooxigenasa
1.1.1.1	Alcohol deshidrogenasa
1.2.1.3	Aldehído deshidrogenasa
6.2.1.3	Acil-CoA de cadena larga sintetasa
1.3.99 / 1.3.8.7	Acil-CoA deshidrogenasa
4.2.1.17 / 1.1.1.35	3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa
2.3.1.16	Acetil-CoA aciltransferasa
1.3.8.1	Butiril-CoA deshidrogenasa
2.3.1.9	Acetil-CoA C- acetiltransferasa
1.3.8.6	Glutaril-CoA deshidrogenasa

Fuente: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

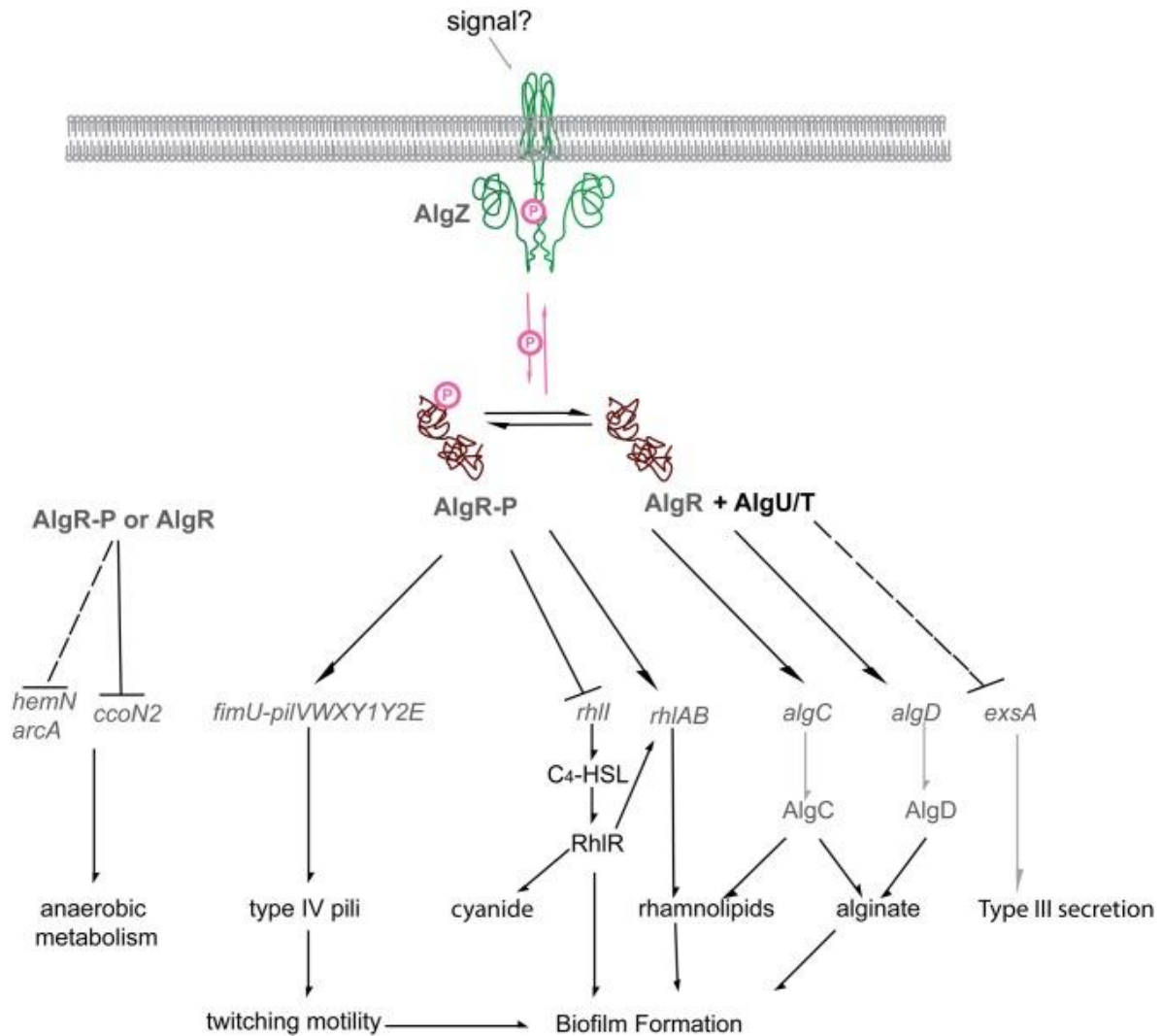


**Figura 3.9.** Enzimas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* que participan en la degradación de los ácidos grasos.

En el contexto de la producción de biosurfactantes, *Pseudomonas* sp., también es considerado un modelo por el conocimiento que se ha alcanzado sobre los genes involucrados en la síntesis (L-ramnosil transferasa (RhIC), glicosil transferasas (RhIB) y fosfomanomutasa (AlgC)) y regulación de ramnolípidos (MvfR y PtxR, como reguladores transcripcionales y AlgR como regulador de respuesta) en *P.aeruginosa* (Das et al., 2015), así como los análisis del transcriptoma que indican que el control de la producción de biosurfactantes se asocia con el control de otros procesos celulares (Okkotsu et al., 2014) ya que, la vía metabólica que interviene en la biosíntesis de los ramnolípidos está estrechamente ligada a la ruta de biosíntesis de ácidos grasos y está relacionada con moléculas que contienen

L-ramnosa o sus precursores, tales como el alginato, tal como se observa en la Figura 3.10 (Jiménez et al., 2010). Por otro lado, Jirku et al. (2015), asociaron los pasos finales de un modelo de biosíntesis de ramnolípidos con la función de tres enzimas (RhIA, RhIB, RhIC), que catalizan la dimerización de dos cadenas de ácido  $\beta$ -hidroxidecanoico (RhIA) y dos reacciones de ramnosilación secuencial, primero produciendo mono-ramnolípidos (RhIB) y luego di-ramnolípidos (RhIC).

Fuente: Okkotsu et al., 2014.



**Figura 3.10.** Representación esquemática del regulón AlgR de *P. aeruginosa*. AlgR fosforilada (AlgR-P), activa la expresión del operón *fimU-pilVWXYZ1Y2E*, así como modula la expresión de *rhlA* (biosíntesis de ramnolípidos), pero reprime a *rhlI*. AlgR no fosforilada (AlgR), activa la expresión de los genes de biosíntesis de alginato.

Entre las investigaciones realizadas sobre los sustratos utilizados por *Pseudomonas* en la producción de tensoactivos, Jiménez et al., (2010) reportaron que la producción de ramnolípidos es estimulada por diferentes tipos de sustratos insolubles, los cuales van desde hidrocarburos alifáticos y aromáticos hasta aceites de origen vegetal; Thavasi et al., (2011) demostraron que *P. aeruginosa* tenía la máxima adhesión celular con petróleo crudo (95,3%), en un tratamiento de biorremediación en microcosmos, degradando por completo las fracciones de C<sub>12</sub> y C<sub>21</sub>, seguido por *Corynebacterium kutscheri* (49,7%), y *Bacillus megaterium* (40,2%) y Petrikov et al., (2013) demostraron que el hexadecano fue el sustrato que más promovió la producción de glicolípidos. Por último, Jirkú et al. (2015), sugirieron que las bacterias que no pertenecen a los géneros *Pseudomonas* sp., o *Burkholderia* sp y que producen ramnolípidos, han adquirido esta capacidad a través de la transferencia horizontal de genes, ya que entre los genomas secuenciados se encuentran pocos genes ortólogos a Rhl. Esta disposición a la transferencia es una oportunidad para la inserción cromosómica dirigida (mediante transposones) de genes RhlA/B en cepas no productoras y con lo cual se pueden empezar a superar las limitaciones en el volumen de producción de los biosurfactantes (Souza et al., 2014).

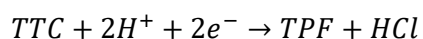
### **3.2.4 Evaluación de la degradación microbiana**

Debido a su relación con procesos de gran importancia en el suelo, se han utilizado métodos biológicos como biomarcadores, es decir, indicadores de la calidad del suelo, especialmente cuando ha sido sometido a contaminación con hidrocarburos del petróleo y se desea realizar el monitoreo y evaluación de la recuperación (Henríquez et al., 2014; Lee et al., 2007). Entre estos métodos se encuentran:

#### **3.2.4.1 Actividad deshidrogenasa**

La actividad de la deshidrogenasa indica la tasa de oxidación de la materia orgánica y como depende de los procesos microbianos que ocurren en el suelo es también considerada un indicador de la actividad microbiana (Lee et al., 2007). El método está basado en la suposición de que en ausencia de O<sub>2</sub> el cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolium (TTC) actúa cuantitativamente como el aceptor terminal de H para el sistema deshidrogenasa con la formación del rojo de trifenil tetrazolium formazan (TPF), tal como se describe en la Ecuación 3.1.

#### **Ecuación 3.1.**



La actividad deshidrogenasa se expresa como  $\mu\text{M TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . (Piotrowska-Cyplik et al., 2013).

#### **3.2.4.2 Respirimetría**

La respirometría es una técnica basada en la medición del consumo de oxígeno por parte de microorganismos que trabajan sobre un sustrato orgánico, el cual es degradado y oxidado a  $\text{CO}_2$ . Este método es útil para evaluar la biodegradación de sustancias químicas específicas, la tratabilidad de residuos orgánicos industriales, el efecto de cantidades conocidas de compuestos tóxicos en la reacción de consumo de oxígeno en una muestra de agua residual o de sustancias químicas orgánicas, entre otros. Cuando se evalúa la mineralización de hidrocarburos en el suelo, el éxito del proceso se interpreta con un aumento inicial en la respiración del suelo (Ahumada & Gómez, 2009; Lee et al., 2007).

#### **3.2.4.3 Actividad lipolítica**

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasa EC 3.1.1.3) son enzimas extracelulares inducibles, es decir que se expresan únicamente cuando el sustrato se encuentra presente y la célula las requiere para poder utilizar dicho sustrato; estas enzimas catalizan la hidrólisis de los triglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol (Castiglioni & Costa, 2015). Ya que los hidrocarburos pueden considerarse lípidos simples y durante su catabolismo generan ácidos grasos, la actividad de las lipasas es una herramienta útil para monitorear la biodegradación de los derivados del petróleo, sin embargo, no se puede tomar como único indicador de la biorremediación, ya que algunos microorganismos como *Bacillus* sp, degradan hidrocarburos pero no expresan la enzima (Cervantes et al., 2013).

La actividad de las lipasas bacterianas se puede determinar mediante diversos métodos como exponen Hasan et al. (2009), pero los más reportados en la literatura son la titulación potenciométrica de los ácidos grasos liberados cuando se usa una suspensión aceite de oliva como sustrato, o por colorimetría, que evalúa la hidrólisis de *para*-nitrofenil fosfato (p-NPP) y define la actividad lipasa como la cantidad de enzima que libera 1,0 mol de nitrofenol por hidrólisis de p-NPP por minuto bajo condiciones estándar (pH 8,0, temperatura 30 ° C y 400 nm) (González et al., 2012; Jiang et al., 2015).

Como se puede observar, la implementación de un sistema de biorremediación debe corresponder a un conocimiento holístico de todo el proceso, partiendo de las condiciones físico-químicas y microbiológicas del material a biorremediar, pasando por un estudio profundo de la ecología, genoma, rutas metabólicas de los microorganismos, hasta el seguimiento y evaluación continua de los procesos.

## **4 ASPECTOS TECNOLÓGICOS DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL PARA TRATAMIENTO POR BIORREMEDIACIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS CONTAMINADOS CON GRASAS Y LUBRICANTES**

Debido a la importancia que la industria metalmeccánica tiene sobre la economía de la ciudad de Manizales, y el impacto ambiental que genera por la diversidad de residuos que produce, algunos de ellos peligrosos; a lo largo de esta revisión del estado del arte, se ha analizado la biorremediación como una alternativa interesante para el tratamiento de residuos contaminados con hidrocarburos. Es así como se revisaron los avances realizados en la biodegradación de sustratos sólidos contaminados con hidrocarburos, los aspectos que influyen en la biodisponibilidad de los contaminantes, la búsqueda, identificación, aumento y/o estimulación de la cantidad de microorganismos degradadores, la comprensión del metabolismo que les confiere dichas capacidades y los métodos de seguimiento y evaluación de la eficacia del proceso, aplicando conceptos de bioquímica y microbiología industrial.

Con el fin de brindar un análisis más completo que pueda guiar futuras investigaciones sobre el tema y para cerrar las brechas entre los conocimientos adquiridos en la academia y su aplicación, dando solución a los problemas de la cotidianidad, es necesario proponer un protocolo para la implementación a nivel industrial de un tratamiento de biorremediación sobre efluentes contaminados con grasas y lubricantes, que en este caso se han dirigido a la industria metalmeccánica, pero que puede ser utilizado como base de investigación en residuos análogos de cualquier tipo de industria. Es de resaltar, que ésta propuesta estará soportada por algunas pruebas y resultados experimentales que se realizaron durante un ejercicio de investigación complementario con el fin de adquirir mayor conocimiento de los procesos.

### **4.1 Metodología para la aplicación a nivel industrial**

Como se indicó anteriormente, en la Figura 1.2., se puede observar el diagrama de flujo para aplicar un proceso de biorremediación sobre residuos sólidos contaminados con grasas y lubricantes. A continuación se detallarán los procedimientos necesarios para llevar a cabo cada una de estas etapas.

#### **4.1.1 Sitio de muestreo y recolección de muestras**

Luego de un análisis de los diferentes residuos producidos por las empresas metalmeccánicas, de los volúmenes de producción, los costos de disposición final y el impacto ambiental generado, se prioriza la zona y el tipo de residuo a tratar,

del cual se recolectan las muestras. Si es necesario, se almacenan en refrigeración a 4°C hasta su tratamiento.

#### **4.1.2 Composición de los residuos industriales**

La velocidad de la degradación microbiana de sustancias contaminantes, se ve afectada por los parámetros fisicoquímicos del sustrato, tales como la presencia de nutrientes, la temperatura, pH, contenido de sales, tamaño de partículas, humedad y porosidad, entre otros, ya que estos influyen en la biodisponibilidad de los contaminantes para la acción microbiana (Arrieta et al., 2012). Por esto, se debe realizar la caracterización fisicoquímica del material a tratar previo a cualquier tratamiento, para poder garantizar las condiciones mínimas de supervivencia de los microorganismos.

#### **4.1.3 Aislamiento y purificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos**

Según Arrieta et al., (2012), el conocimiento de la diversidad microbiana del suelo es de gran importancia para determinar qué poblaciones pueden estar implicadas en la degradación de hidrocarburos, ya que éstos microorganismos nativos están adaptados a las variables ambientales y fisicoquímicas del material a tratar y producen enzimas extracelulares que les permite ser viables durante más tiempo y aumentar la velocidad de transformación de los contaminantes en sustancias más inocuas y asimilables (González et al., 2012; Rodríguez et al., 2015).

Para el aislamiento, se recomienda someter las muestras a un pre-enriquecimiento, adicionando 100 g de cada una de éstas a 250 mL de caldo básico de sales (CBS) a 32°C, en agitación constante a una velocidad de 140 rpm, durante un período de siete días (Narvárez- Flórez et al., 2008; Vásquez et al., 2010). Al finalizar el pre-enriquecimiento, se toma un inóculo y se hacen diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$  en agua peptonada con dos gotas de Tween 80, realizando siembra por superficie de las tres últimas diluciones en placas de Agar Cetrimide, para aislamiento de *Pseudomonas*; Agar Tributirina, para identificación de microorganismos lipolíticos; y/o en medio selectivo de Sales Minerales Bushnell Hass (BHMS), utilizado en estudios de degradación microbiana de hidrocarburos, ya que contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos, excepto la fuente de carbono que se complementa con la muestra a analizar (HiMedia Labs, 2015). Estas placas deben incubarse a 30°C durante 72 horas.

Luego del aislamiento, se purifican las colonias obtenidas por repiques individuales en placas del agar elegido y se incuban bajo las condiciones previamente establecidas.

#### **4.1.4 Caracterización e identificación microbiana**

##### **4.1.4.1 Caracterización fenotípica**

La caracterización morfológica de una bacteria depende de su factibilidad de cultivo, y se basa en las características «observables» a nivel macroscópico formando colonias, o a nivel microscópico, por la estructura celular. Las pruebas bioquímicas permiten complementar la caracterización morfológica, dando información sobre el metabolismo del microorganismo (Bou et al., 2011).

Para tener una descripción más detallada de las características fenotípicas de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, se recomienda realizar además la Tinción Azul de Nilo, que es un análisis cualitativo de la acumulación de PHA (Rodríguez et al., 2015) y pruebas bioquímicas rápidas como la batería de pruebas API 20NE.

##### **4.1.4.2 Caracterización genotípica**

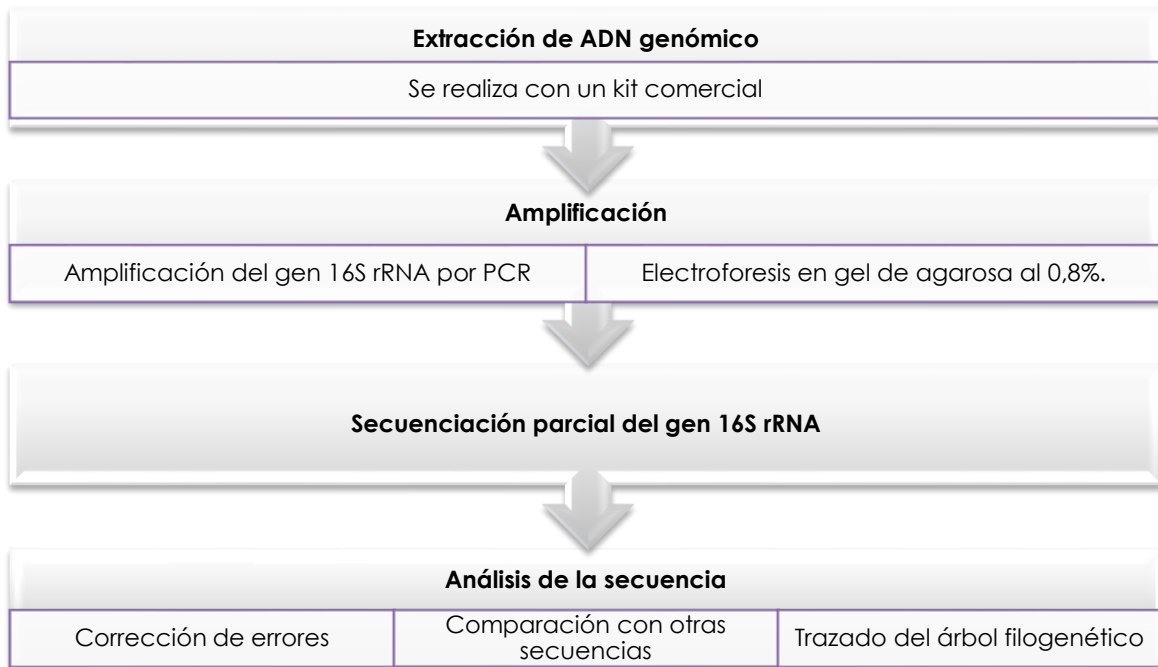
Las dificultades en el cultivo de algunos microorganismos, la ausencia de concordancia entre las características morfológicas del aislamiento en estudio y las correspondientes a las cepas de la especie tipo, hacen que los métodos genotípicos de identificación bacteriana sean considerados como procedimientos complementarios o alternativos a la caracterización fenotípica (Bou et al., 2011; Fernández et al., 2010).

Para los estudios taxonómicos o de filogenia bacteriana, se puede utilizar una amplia variedad de genes como dianas moleculares, como el ARNr 16S, ARNr 16S-23S, ARNr 23S, *rpoB* (subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa) y *gyrB* (subunidad  $\beta$  de la ADN girasa), entre los cuales el primero es el más utilizado (Bou et al., 2011).

Según Rodríguez et al., (2015) la identificación genómica incluye las etapas relacionadas en la Figura 4.1.



Fuente: elaboración propia.



**Figura 4.1.** Etapas de la identificación genotípica.

#### 4.1.5 Tolerancia y degradabilidad de grasas

Luego del aislamiento y la caracterización microbiológica, es indispensable realizar pruebas de biofactibilidad para determinar las concentraciones y tipos de contaminantes sobre los cuales pueden sobrevivir los microorganismos seleccionados, y los estudios de biodegradabilidad para cuantificar el porcentaje de remoción de hidrocarburos a nivel de laboratorio, con el objetivo de predecir el tiempo que tomará la biodegradación en campo (Arrieta et al., 2012).

La tolerancia y degradabilidad de los microorganismos endógenos sobre los residuos grasos y diferentes hidrocarburos, se determina mediante el empleo del caldo de sales Bushnell Hass o caldo nutritivo, suplementado con el hidrocarburo a evaluar en diferentes concentraciones para estimar la concentración máxima del contaminante que es soportada por el microorganismo. Los cultivos se deben incubar a 30°C y realizar evaluaciones de turbidez durante 21 días (Narváez et al., 2008). A las muestras que tengan crecimiento, se les evalúa el contenido de ácidos grasos.

La variable respuesta de la degradabilidad de los microorganismos seleccionados, es el contenido de ácidos grasos en las diferentes

concentraciones evaluadas a través del tiempo de contacto y las diferentes evaluaciones de actividad microbiana expuestas en el capítulo 3.

#### **4.1.6 Alternativas de aplicación industrial**

Por las características del residuo evaluado, la opción más común de tratamiento que es posible proponer, es el compostaje; sin embargo, para tener un panorama más general y controlado del proceso, esta tecnología se puede encarar como un sistema de Fermentación en Estado Sólido, en la cual se apliquen variables de diseño que sean susceptibles a la optimización. A continuación se exponen los fundamentos teóricos de ambas tecnologías.

##### **4.1.6.1 Compostaje**

De acuerdo a la información previa relacionada en el apartado 2.3.2, sobre la tecnología del compostaje, ésta alternativa se tiene en cuenta con el fin de obtener un lodo estabilizado sin contaminantes hidrocarbonados, que puede disponerse como residuo ordinario por su composición inocua para el medio ambiente.

##### **4.1.6.2 Fermentación en estado sólido (SSF)**

La fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés) es un proceso biotecnológico para el cultivo de microorganismos en sistemas heterogéneos de tres fases, que comprende un sustrato sólido de baja humedad (la suficiente para apoyar el crecimiento y la actividad metabólica del microorganismo) y una fase gaseosa determinada por la porosidad de las partículas (Bücker et al., 2015; Robinson et al., 2002).

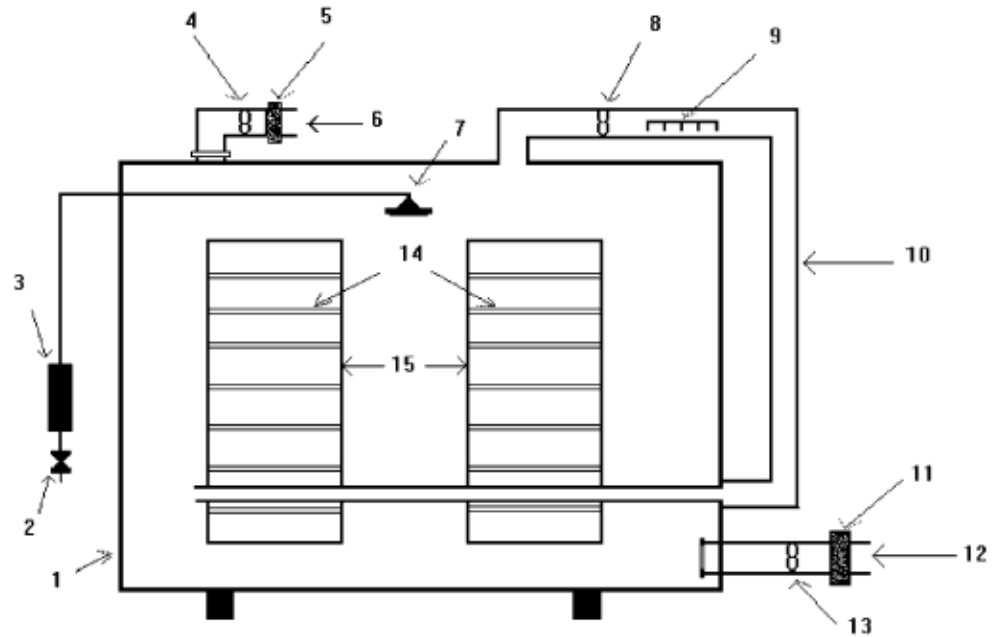
Las principales aplicaciones de la tecnología SSF son la producción de sustancias de valor agregado, tales como alimentos fermentados, combustibles, enzimas y otros metabolitos secundarios como ácidos orgánicos, antibióticos, biosurfactantes y compuestos aromáticos (Durand, 2003; Robinson et al., 2002; van de Lagemaat & Pyle, 2001). En los últimos años también ha tenido un gran desarrollo en las áreas de biorremediación y biodegradación de compuestos peligrosos, la producción de compost y el enriquecimiento nutricional de alimento animal a partir de residuos sólidos (Behera & Ray, 2015; Bücker et al., 2015; Thomas et al., 2013). Una de las principales ventajas de la SSF es la posibilidad de utilizar subproductos y residuos agroindustriales como sustratos (fuente de carbono) con el fin de generar productos de alto valor añadido (Bücker et al., 2015), resolviendo el problema de la eliminación de dichos residuos, que de otro modo causarían contaminación; reflejándose en la viabilidad económica y la ecosostenibilidad

de esta tecnología (Thomas et al., 2013), además de mostrar altos rendimientos en cortos períodos de tiempo (Robinson et al., 2002).

Autores como Behera & Ray (2015); Bück et al., (2015); Durand (2003); Farinas (2013) y Thomas et al., (2013); afirman que durante la última década ha habido una mejora sustancial en la comprensión fundamental de los aspectos de ingeniería bioquímica, al considerar las relaciones que existen entre la fisiología de los microorganismos y los factores fisicoquímicos del proceso, lo que permite hacer una selección de microorganismos orientada al sustrato, la optimización de los parámetros biológicos y fisicoquímicos y la purificación de los productos deseados. No obstante, el escalado de los procesos de SSF ha sido un desafío por la naturaleza heterogénea de los sustratos, ya que, al ser generalmente residuos agroindustriales, presentan diversas composiciones, tamaños de partícula, resistencia mecánica, porosidad y capacidad de retención de agua, lo que afecta los parámetros de diseño, el modelamiento matemático, la cinética y, el control de la transferencia de oxígeno y la temperatura, razón por la cual se han desarrollado varios diseños para los biorreactores SSF (Thomas et al., 2013), que se clasifican ya sea por la escala en que operan o por las características de aireación y mezclado.

Durand (2003), realizó una clasificación de acuerdo a la cantidad de material seco a utilizar, en: biorreactores de escala de laboratorio, los cuales incluyen cajas Petri, frascos de boca ancha, Erlenmeyer, y otros diseños más o menos sofisticados; y, biorreactores a nivel piloto y a escala industrial, donde se utilizan desde varios kilogramos hasta toneladas del sustrato con diseños mucho menos variados, debido a las restricciones en la transferencia de masa y calor, la aireación, las características fisiológicas del microorganismo y a las necesidades de manipulación y mantenimiento. A este tipo de biorreactores, los clasificó en cuatro grupos, basado en la forma en que se mezclan y airean, de una forma muy similar a la que cita Santis (2013):

- **Grupo I (Biorreactores sin agitación forzada):** son los más antiguos y sencillos, también conocidos como reactores tipo bandeja, donde el lecho es estático, de una altura máxima de 15 cm y al aire circula a su alrededor, como se observa en la Figura 4.2. Esta tecnología requiere de grandes áreas (salas de incubación) y mano de obra intensiva.

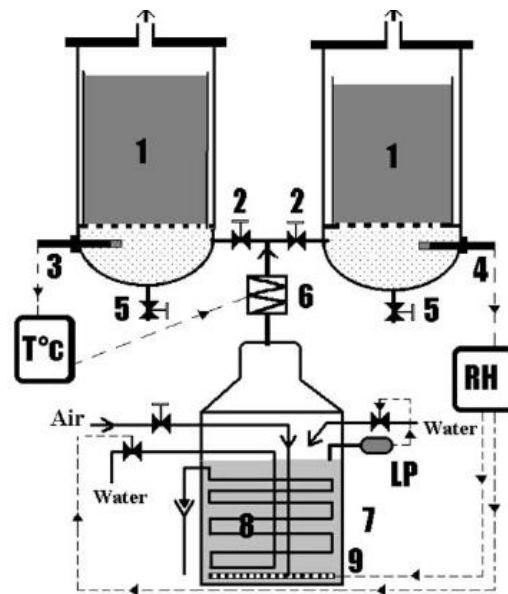


(1) Koji room, (2) water valve, (3) UV tube, (4, 8, 13) air blowers, (5, 11) air filters, (6) air outlet, (7) humidifier, (9) heater, (10) air recirculation, (12) air-inlet, (14) trays, (15) tray holders.

Figura 4.2. Reactor de bandejas

- **Grupo II (Biorreactores sin mezcla con agitación forzada):** también conocidos como reactores de lecho empacado, donde el lecho es estático y se hace pasar aire forzadamente a través de un tamiz que actúa como soporte del sustrato, tal como se observa en la Figura 4.3. El diámetro del reactor y la altura de la capa de sustrato son alrededor de 40 cm, por lo que son útiles para predecir el comportamiento en volúmenes mayores. Aunque no existe agitación mecánica dentro de estos reactores, el medio se puede agitar manualmente.

Fuente: Durand, 2003.



- (1) Basket containing the solid medium, (2) valves for airflow adjustment, (3) air temperature probe, (4) relative humidity probe, (5) draincocks, (6) heating box, (7) humidifier, (8) coil for circulation of cold water, (9) resistive heater.

Figura 4.3. Biorreactor de lecho empacado.

- **Grupo III (Biorreactores de mezcla continua con circulación de aire):** Esta categoría es esencialmente un tambor giratorio continuo que maximiza la exposición de las partículas del sustrato, al aire que circula libremente alrededor del lecho, como se observa en la Figura 4.4.

Fuente: Durand, 2003.

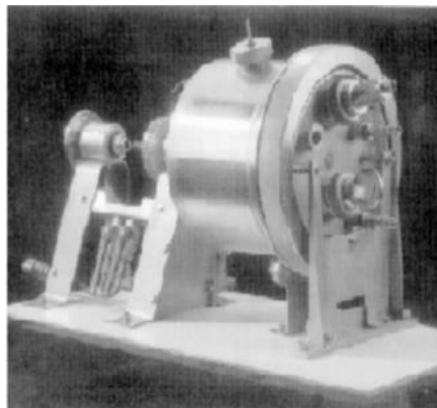
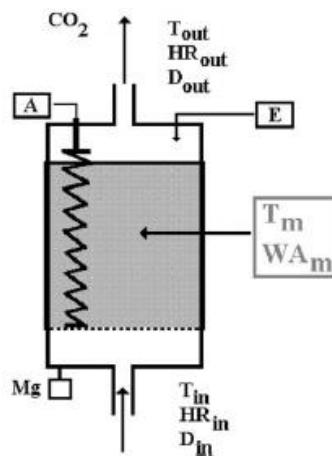


Figura 4.4. Tambor giratorio discontinuo.

- **Grupo IV (Biorreactores de lecho empacado con mezcla intermitente y aireación forzada):** En general, estos biorreactores pueden ser descritos como lechos a través de los cuales se hace pasar el aire y se agitan periódicamente mediante un dispositivo mecánico, como se observa en la Figura 4.5. El diseño de estos reactores, cuya capacidad varía desde unos pocos kilogramos a varias toneladas, está influenciado por la necesidad o no de operar en condiciones estériles. A este grupo pertenecen los “biorreactores de lecho gas-sólido fluidizado”, el “tambor basculante” y “biorreactores aireado-agitados”.

Fuente: Durand, 2003.



**Figura 4.5.** Esquema de un biorreactor de lecho empacado con mezcla intermitente y aireación forzada.

#### 4.1.6.3 Producción, extracción y purificación de lipasas por FSS

Al analizar la fermentación en estado sólido como una opción más controlada para la biodegradación de residuos contaminados con grasas y aceites lubricantes, y con el fin de dar cumplimiento al objetivo general de esta revisión con una visión más amplia, surge la idea de integrar la ingeniería de bioprocesos a la disciplina microbiológica para aprovechar los residuos de la industria metalmeccánica para la producción de enzimas lipolíticas, a la par que se logra la estabilización de los lodos generados por tal industria, minimizando la contaminación ambiental.

Las lipasas o enzimas lipolíticas son producidas por una gran variedad de microorganismos que incluyen mohos, levaduras y bacterias (Castiglioni & Costa, 2015; Hasan et al., 2009), los cuales proliferan y se pueden aislar de aguas

residuales y efluentes contaminados con grasas como los de la industria metalmeccánica (Hasan et al., 2009). Varios estudios han utilizado residuos agroindustriales como sustratos para la producción de lipasas por fermentación en estado sólido, entre los que se encuentran la utilización de tortas de semillas de *Jatropha curcas* (Joshi & Khare, 2013); torta de cacahuete, de salvado de arroz, salvado de trigo, torta de neem, y tarta de coco (Neethu et al., 2015) y residuos de la industria de producción y refinado de aceites vegetales (Santis, 2013).

Luego de la fermentación, la extracción y purificación de las enzimas obtenidas son pasos determinantes en la valorización de residuos. Las técnicas y procedimientos para realizar estas operaciones, han sido estandarizadas por varios autores como describen Hasan et al., (2009); Joshi & Khare, (2013); Neethu et al., (2015) y Santis (2013), entre otros. En general, para la extracción, se realizan mezclas del sustrato fermentado con una solución tampón seguida de agitación y una posterior centrifugación de la suspensión, siendo el sobrenadante el extracto enzimático crudo; mientras que la purificación se realiza por métodos de concentración como la ultrafiltración, seguida de cromatografía de filtración en gel y liofilización utilizada por Joshi & Khare (2013), o la concentración por precipitación con acetona fría, seguida de centrifugación y posterior aplicación en columna de intercambio aniónico realizada por Neethu et al., (2015).

#### **4.1.7 Selección del proceso e identificación de las variables de diseño**

Ya que la fermentación en estado sólido se puede realizar bajo condiciones controladas y reproducibles, además de que permite obtener productos de mayor valor agregado que el compostaje, se selecciona como la alternativa de tratamiento más promisoría para los residuos evaluados.

Para establecer un sistema de tratamiento por medio de fermentación en estado sólido, se deben tener en cuenta algunos criterios básicos para el diseño del biorreactor, como los que exponen Ruíz et al., (2007):

- Área de contacto suficiente entre las fases biótica y abiótica del sistema, es decir, con un sistema adecuado de aireación y agitación para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos.
- Consumo mínimo posible de energía.
- Entradas para la adición de nutrientes y el control de pH.
- Control de transferencia de calor y estabilización de temperatura, ya que el crecimiento microbiano es generalmente exotérmico.
- Suministro de oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo.

#### 4.1.8 Diseño, análisis de sensibilidad y optimización de variables

La optimización es una herramienta de la ingeniería que permite enfrentar problemas como el costo de la energía, las regulaciones ambientales cada vez más estrictas, y la competencia global en el precio y calidad del producto (Himmelblau, 2001).

En los procesos biotecnológicos, la optimización se enfoca en tres aspectos: optimización de sustratos, optimización de microorganismos y optimización de procesos. Ya que el sustrato analizado en esta revisión es un residuo de composición definida y los microorganismos a utilizar son autóctonos del material, es decir están adaptados a las condiciones del sustrato, en esta revisión, se apunta a la optimización del proceso, con la cual se busca definir las mejores condiciones para el tratamiento, que repercutan en disminución de gastos energéticos, cumplimiento de la normativa ambiental, reducción de costos de operación, mayor eficiencia y aumento de la rentabilidad.

Para optimizar un proceso químico, es fundamental sintetizarlo en un diagrama de flujo, analizando los pasos individuales de transformación y las interconexiones que entre ellos se presentan para lograr la transformación global requerida (Smith, 2005). El diagrama de flujo para el tratamiento por fermentación en estado sólido que se propone en este trabajo se muestra en la Figura 4.6.

Luego de definir este diagrama de flujo, es posible llevar a cabo la simulación del proceso con la cual se pretende predecir el comportamiento del proceso a nivel experimental y así poder reducir costos de investigación y desarrollo.

Fuente: elaboración propia.

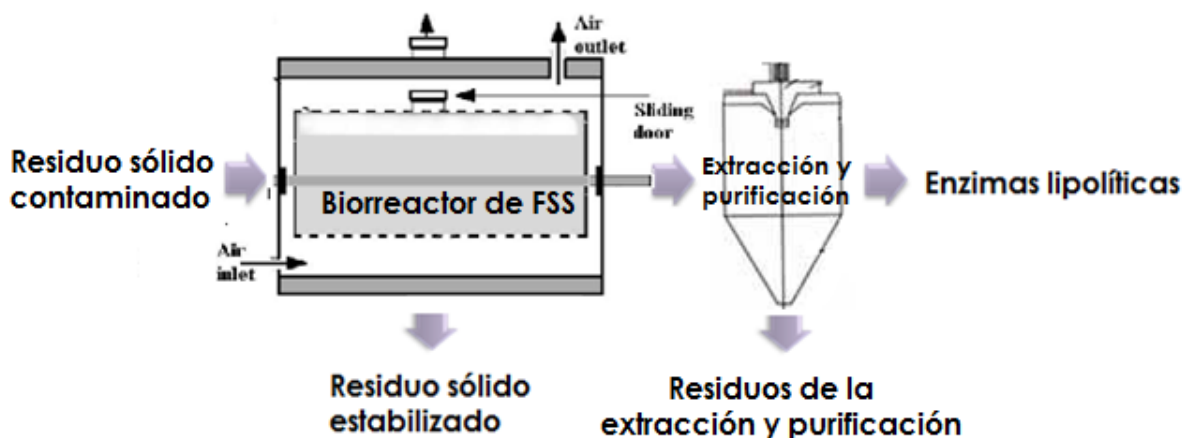


Figura 4.6. Diagrama de flujo para el tratamiento por fermentación en estado sólido.



La simulación depende del modelo matemático y de un software, que puede ser comercial como ASPEN® y SuperPro Designer® o un lenguaje de programación como MATLAB®. Luego de la generación del modelo matemático que para un proceso biotecnológico, depende directamente de la cinética del microorganismo, se puede evaluar el rendimiento del diseño, mediante la manipulación y cuantificación de variables como la concentración de los microorganismos, el tiempo de retención, las necesidades de transferencia de calor, las inhibiciones por sustrato o por producto, entre otras (Smith, 2005).

#### **4.1.9 Seguimiento del proceso en escala piloto**

Luego de la optimización de variables por medio de la simulación y de ejercicios experimentales a nivel de laboratorio, se procede a llevar el proceso a nivel piloto o a escala industrial para evaluar el desempeño real del tratamiento.

#### **4.1.10 Caracterización de productos y evaluación económica**

Con la simulación, también es posible evaluar el rendimiento del proceso diseñado. Esta evaluación, puede realizarse desde la sostenibilidad ambiental, que busca la eficiencia en la utilización de materias primas y la minimización en la generación de residuos y uso de energía y otros recursos naturales; aunque, según Smith (2005), el primer criterio de evaluación es el económico.

Con la estimación cualitativa y cuantitativa de los productos a obtener en la fermentación en estado sólido a nivel piloto o nivel industrial, es posible realizar la evaluación económica para determinar si el proceso es factible, y permite efectuar una proyección económica de la inversión que debe hacerse para implementar la tecnología de biorremediación y cuánto tiempo es necesario para recuperar dicha inversión.

### **4.2 Caso de estudio: biodegradación por compostaje de un residuo sólido contaminado con grasas y aceites de una empresa metalmeccánica de la ciudad de Manizales**

A continuación se exponen y discuten los resultados obtenidos durante un ejercicio de investigación complementario que se ejecutó con el fin de ejemplificar la información teórica suministrada, mediante la realización de algunas de las pruebas sugeridas en la metodología propuesta para la implementación de un sistema de biorremediación a nivel industrial.

#### 4.2.1 Sitio de muestreo y recolección de muestras

Se eligió una mezcla de sólidos orgánicos provenientes de la zona de pulido de herramientas agrícolas de una empresa metalmecánica ubicada en la ciudad de Manizales, Caldas, Colombia a una altura de 2150 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 18°C (Alcaldía de Manizales, 2015).

Las muestras fueron recogidas aleatoriamente en bolsas Ziploc® de 500 g de las canecas donde se almacena el residuo y/o de la zona de generación directamente.

#### 4.2.2 Caracterización fisicoquímica de los residuos industriales

En el caso del residuo de pulido, que se observa en la Figura 4.7, se cuenta con una muestra sólida pastosa, producto de la mezcla de aserrín, fique, grasa animal y residuos de aceite mineral, que según el análisis Soxhlet tiene una composición de grasa de 43,69% en base seca (Universidad Nacional de Colombia, 2014), y, según el Laboratorio de Nutrición Animal y Vegetal de la Universidad de Caldas, contiene 0,47% de nitrógeno total, 5,82% de humedad y 94,18% de materia seca, de la cual el 44,35% corresponde a cenizas totales y el 55,65% a materia orgánica (Universidad de Caldas, 2015).

Fuente propia.



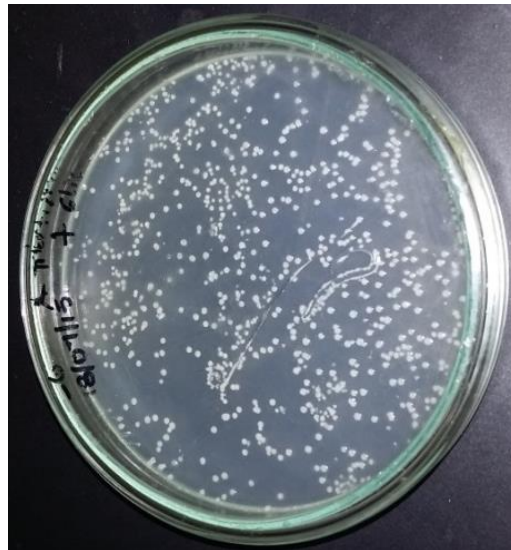
**Figura 4.7.** Residuo sólido de pulido contaminado con grasa animal y aceite lubricante mineral.

### 4.2.3 Aislamiento y purificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos

Se tomaron 10 g de muestra y se añadieron a 90 mL de peptona (Dilución  $10^{-1}$ ). Se llevó la mezcla a agitación durante 24 horas a  $24^{\circ}\text{C}$ . Luego se hicieron diluciones seriadas de la muestra hasta  $1 \times 10^{-6}$  en agua peptonada con dos gotas de Tween 80, y se sembraron por superficie las tres últimas diluciones en placas de Agar Tributirina + glicerol y Agar Nutritivo, para identificación de microorganismos lipolíticos. Cada una de las diluciones se sembró por duplicado y se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas. En la Figura 4.8, se observa la dilución  $10^{-6}$  en agar tributirina del residuo sólido graso, luego de la incubación.

Al obtener las colonias distribuidas en la caja, se pudieron diferenciar macroscópicamente dos clases de colonias predominantes, que fueron repicadas individualmente a cajas con Agar Nutritivo (por duplicado), realizando siembra por agotamiento para obtener colonias aisladas totalmente y proceder a su caracterización fenotípica.

Fuente propia

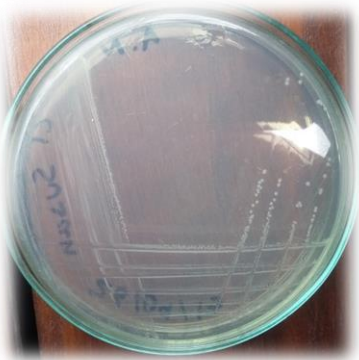

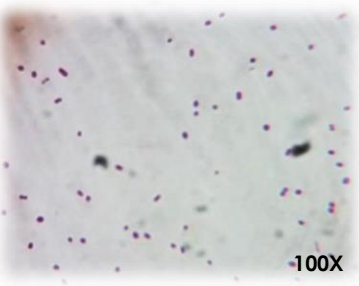
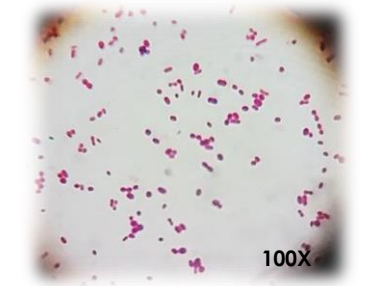


**Figura 4.8.** Dilución  $1 \times 10^{-6}$  en Agar Tributirina de la muestra de residuo sólido graso.

### 4.2.4 Caracterización fenotípica microbiana

La caracterización morfológica se realiza con base en los criterios del Manual Bergey, analizando colonias obtenidas en medio Nutritivo luego de una incubación a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 48 h. Para el residuo sólido graso, se obtuvieron dos colonias morfológicamente diferentes, cuyas características se resumen en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Caracterización fenotípica de las colonias obtenidas del residuo sólido graso.

<b>CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS</b>		
<b>MICROORGANISMO</b>		
	<b>C1</b>	<b>C2</b>
<b>COLOR</b>	Blanco	Crema
<b>ASPECTO</b>	Opaco	Opaco
<b>TEXTURA</b>	Cremosa	Cremosa
<b>SUPERFICIE</b>	Lisa superficial	Lisa superficial
<b>ELEVACIÓN</b>	Plana	Plana
<b>BORDE</b>	Entero con formación de halo	Entero con formación de halo
<b>FORMA</b>	Circular	Circular
<b>CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS</b>		
<b>TINCIÓN DE GRAM</b>		
	100X Cocos Gram positivos	100X Cocos Gram positivos

Fuente: elaboración propia.

#### 4.2.5 Alternativa de aplicación industrial: Compostaje

Como ejercicio experimental, el 2 de febrero de 2015, se realizó una prueba piloto con una pila de compostaje de 500 kg del residuo graso, aplicándole un inóculo comercial con capacidad biodegradadora comprobada previamente, en una concentración de 2%. Se realizó volteo dos veces por semana, para asegurar la aireación y se hizo seguimiento de la temperatura al interior de la pila, como variable indicadora de las fases del compostaje durante 95 días. Los resultados de este proceso se muestran en la Tabla 4.2 y la Figura 4.9.

**Tabla 4.2.** Registro de temperatura para las pilas de residuo graso

FECHA	T. PILA (°C)	FECHA	T. PILA (°C)
02/02/15	21	20/03/15	32
06/02/15	35	24/03/15	38
10/02/15	42	27/03/15	36
13/02/15	44	31/03/15	38
17/02/15	59	07/04/15	34
20/02/15	60	14/04/15	38
24/02/15	50	17/04/15	40
03/03/15	44	21/04/15	34
06/03/15	40	05/05/15	38
10/03/15	44	08/05/15	40
17/03/15	36		

Fuente: elaboración propia.



**Figura 4.9.** Temperatura mostrada durante el compostaje para la pila evaluada.

Luego de los tres meses de seguimiento, se realizó un análisis Soxhlet para evaluar el contenido de grasa de la pila, obteniéndose una reducción al 33,17%.

## **4.2.6 Discusión de resultados**

### **4.2.6.1 Caracterización fisicoquímica**

Según Pérez, (2009) un aceite mineral habitual está compuesto por cerca del 75% de hidrocarburos parafínicos y, Bailey, (1984) afirma que la grasa de cerdo tiene una composición aproximada de 38,6% de ácidos grasos saturados, 54,4% de ácidos monoinsaturados, como el ácido oleico y 7% de ácidos poliinsaturados como el ácido linoleico. De acuerdo al 43,69% de contenido de grasa<sup>13</sup> obtenido en la caracterización fisicoquímica, se puede deducir que los hidrocarburos parafínicos y ácidos grasos mencionados actúan como fuente de carbono durante el proceso de biorremediación.

Por otro lado, el bajo porcentaje de nitrógeno (0,47%), sugiere que éste y otros nutrientes, deben ser añadidos de forma suplementaria durante el tratamiento para permitir el adecuado metabolismo de los microorganismos.

### **4.2.6.2 Aislamiento y purificación de bacterias**

Del aislamiento realizado en placas para identificación de microorganismos lipolíticos, se obtuvieron colonias con diferencias macroscópicas, de las cuales dos fueron predominantes y mostraron el halo lipolítico esperado. Este resultado, demuestra que efectivamente, el residuo estudiado posee flora bacteriana autóctona con la capacidad metabólica que la hace promisoría para su aplicación en procesos de biorremediación, de manera similar al trabajo conducido por Vásquez et al., (2010).

### **4.2.6.3 Caracterización fenotípica**

Se obtuvieron dos colonias levemente diferentes a nivel macroscópico por su tamaño y coloración. Con la tinción de Gram, se determinó que ambas son Gram positivas y por la forma celular se clasifican como cocos, observándose en la colonia dos (C2) la tendencia a formar diplococos. Sin embargo; estas características no permiten establecer exactamente si las colonias estudiadas pertenecen a microorganismos diferentes o si solo se encuentran en diferentes estadios de desarrollo.

Relacionando esta caracterización preliminar y los géneros bacterianos reportados en la literatura por su capacidad biodegradadora de suelos contaminados con aceites y residuos grasos, se sugiere continuar con la ruta de

---

<sup>13</sup> Composición en base seca.

pruebas bioquímicas recomendadas para *Micrococcus* y *Rhodococcus*, ya que ambos géneros son cocos Gram positivos (Sprocati et al., 2011; Thangarajan et al., 2011; Vásquez et al., 2010).

#### **4.2.6.4 Compostaje**

Es de anotar que, para tener resultados significativos estadísticamente, debieron haberse realizado varias repeticiones del montaje, además de inocular la muestra con los microorganismos autóctonos aislados previamente. No obstante; por ser éste, un ejercicio preliminar que no busca presentar resultados contundentes, sino más bien, servir de abrebocas a futuras investigaciones, sólo se hizo una prueba.

La reducción de una composición inicial de 43,69% de grasa al 33,17% presente luego de los tres meses de compostaje, permite entrever que este proceso a escala industrial, al contrario que los estudios realizados a nivel laboratorio y escala piloto (González et al., 2012; Sayara et al., 2010; Sprocati et al., 2011; Vásquez et al., 2010), requiere altos tiempos de tratamiento los cuales serían insostenibles en una industria generadora de grandes cantidades de residuos.

## 5 CONCLUSIONES

El sector metalmeccánico de la ciudad de Manizales tiene un alto impacto en la generación de empleo y economía de la ciudad. Aunque las empresas del sector son muy diversas en cuanto al tipo y la trayectoria que tienen, es una necesidad común, la actualización de tecnologías y la innovación para el desarrollo de procesos más amigables con el medio ambiente, ya que este es un punto crítico que afecta las actividades de internacionalización y la posibilidad de entrar en nuevos mercados, además de que influye directamente en los indicadores de sostenibilidad y competitividad de la ciudad.

En las diferentes etapas de los procesos metalmeccánicos se produce una gran cantidad y variedad de sustancias contaminantes para el medio ambiente y la salud humana que al mostrarse recalcitrantes a los tratamientos convencionales de degradación, suelen ser descargados directamente al suelo o las fuentes hídricas, o son incinerados, lo que genera emisiones gaseosas tóxicas. Para contrarrestar esta situación, y debido a las limitaciones que presentan los tratamientos físicos y químicos, las tecnologías de biorremediación se hacen cada día más atractivas.

Cada estrategia de biorremediación tiene ventajas y desventajas específicas, las cuales deben ser considerados para cada situación. La evaluación y elección del método de tratamiento requiere establecer un panorama general desde el conocimiento físico-químico del residuo como los niveles de nutrientes y la presencia de sustancias tóxicas, la diversidad microbiana presente y su potencial metabólico, la biodisponibilidad del contaminante, la temperatura a la que se desarrolla el proceso, etc.

Las numerosas investigaciones científicas que se describen en esta revisión, han demostrado que las diferentes estrategias de biorremediación evaluadas para el tratamiento de efluentes metalmeccánicos contaminados con grasas y lubricantes son promisorias a nivel de laboratorio; pero, es necesario realizar mayores investigaciones a nivel de planta piloto y a escala industrial, para estimar los efectos del escalado en el rendimiento de los procesos.

El compostaje es un proceso incipiente de fermentación en estado sólido de bajo costo que se puede considerar como alternativa para disminuir el volumen de residuos generados por la industria metalmeccánica; sin embargo, por los altos tiempos de proceso y el poco control que se ejerce sobre las variables, ésta opción puede ser insostenible en empresas con alta generación de dichos residuos. Además de que demanda espacios considerables dentro de las instalaciones para realizar este proceso.



El contenido de grasas y aceites presente en un residuo industrial, puede ser reducido empleando biorreactores de fermentación en estado sólido, en el cual se controlan las variables del proceso y además, permite obtener otras sustancias de alto valor comercial como son las enzimas lipolíticas. Para hacer el diseño de estos procesos se cuenta con herramientas de simulación que permiten disminuir los costos de investigación, por lo cual se considera que la FSS es una estrategia con alto potencial de aplicación industrial que requiere de mayor investigación.

La puesta en práctica de las pruebas experimentales, permitió confirmar la importancia de poseer claridad y una vasta fundamentación teórica previa sobre el proceso y las técnicas a utilizar para realizar adecuadamente el aislamiento, purificación e identificación de los microorganismos de interés; así como su posterior aplicación en campo.

Uno de los factores que probablemente influyó en el bajo porcentaje de degradación obtenido en el ejercicio experimental de compostaje, es la alta relación C/N del material, ya que es rico en sustancias carbonadas y carece de una fuente de nitrógeno clara. Por lo tanto, se recomienda repetir estas pruebas experimentales, asegurando los requerimientos nutricionales para la actividad eficiente de los microorganismos, y así poder evaluar el máximo porcentaje de degradación alcanzado para este residuo.

## 6 REFERENCIAS

- Abarrataldea. (2005). Manual práctico de técnicas de compostaje. Obtenido de [www.abarrataldea.org](http://www.abarrataldea.org)
- Abdul Jaffar alia, H., Tamilselvib, M., Soban Akrama, A., Kaleem Arshana, M.L. Sivakumar, V. (2015). Comparative study on bioremediation of heavy metals by solitary ascidian, *Phallusia nigra*, between Thoothukudi and Vizhinjam ports of India. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 121 (93–99).
- Acero, H (2008). Plan de gestión integral de residuos peligrosos de la Fábrica Santa Bárbara de la Industria Militar "INDUMIL". Universidad de la Salle, Facultad de ingeniería ambiental y sanitaria. Bogotá, Colombia.
- Agnello, A.C., Bagrad, M., van Hullebusch, E.D., Esposito, G. & Huguenot, D. (2015). Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of the Total Environment*. Article in Press. Disponible online en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969715308779>.
- Ahumada, M. & Gómez, R. (2009). Evaluación y selección de bacterias degradadoras de fenol por respirometría.
- Alcaldía de Manizales - Secretaría de TIC y Competitividad & Cámara de Comercio de Manizales por Caldas – CCMPC. (2014). Caracterización sector metalmecánico de la ciudad de Manizales. Recuperado el 9 de diciembre de 2015 de [http://www.ccmpec.org.co/ccm/contenidos/51/Caracterizacion\\_Sector\\_Metalmecanico.pdf](http://www.ccmpec.org.co/ccm/contenidos/51/Caracterizacion_Sector_Metalmecanico.pdf).
- Álvarez, M. E. (2013). Vinculación universidad-sociedad: Estudio de un equipo de trabajo en el área de gestión ambiental de la Universidad Nacional de La Plata. Tesis de grado. Universidad Nacional de La Plata. Argentina. Recuperado el 12 de diciembre de 2015 de: <http://www.memoria.fahce.unlp.edu.ar/tesis/te.851/te.851.pdf>.

- ANDI & ILAFA (2011). La cadena de valor siderúrgica y metalmeccánica en Colombia en la primera década del siglo XXI. Recuperado el 10 de diciembre de 2015 de [www.andi.com.co](http://www.andi.com.co).
- APROLAB. (2007). Manual para la producción de compost con microorganismos eficaces. Perú: Programa de apoyo a la formación profesional para la inserción laboral.
- Arrieta, O., Rivera, A., Arias, L., Rojano, B., Ruiz, O. & Cardona, S. (2012). Biorremediación de un suelo con diésel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Gestión y Ambiente*, Vol. 15, N°. 1, (27-39).
- Astashkina, A., Bakibayeva, A., Plotnikova, E., Kolbysheva, Yu. & Mukashev, A. (2015). Study of the hydrocarbon-oxidizing activity of bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Rhodococcus*. *Procedia Chemistry* 15, (90 – 96).
- Bailey, A. (1984). Aceites y grasas industriales. Editorial Reverté. Edición en español. España. P.177.
- Behera, S. & Ray, R. (2015). Solid State Fermentation for Production of Microbial Cellulases: Recent Advances and Improvement Strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*. Article in press, disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090>
- Behling, E., Marín, J., Gutiérrez, E. & Fernández, N. (2003). Tratamiento aeróbico de dos efluentes industriales utilizando reactores biológicos rotativos de contacto. *Multiciencias*, Vol. 3, N°. 2, Universidad del Zulia, Venezuela.
- Benito, Y. (2015) Módulo 4: Tecnologías para el Tratamiento de los Residuos. CIEMAT, 3ª edición. España.
- BID & Findeter (2015), Manizales sostenible y competitiva. Prioridades y bases para el plan de acción. Recuperado el 14 de diciembre de 2015 de <http://www.manizales.gov.co/RecursosAlcaldía/201505291418448411.pdf>.
- BORSI ORG. (2015). Bolsa de residuos y subproductos industriales. <http://www.borsi.org/>.
- Bou, G., Olmos, A., García, C., Sáez, J. & Valdezate, S. (2011) Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29(8):601–608.

- Bronzini, M., Cambiaghi, R., Cirvini, L., Gentili, A. & Oliva, M. (2011). Industrias y servicios I: Metalmecánica. Universidad Nacional de Cuyo. Argentina.
- Büek, A., Casciatori, F., Thoméo, F., Tsotsas, E. (2015). Model-based control of enzyme yield in solid-state fermentation. *Procedia Engineering* 102 (362–371).
- Candian, N.C., Auza, E. & Borges, M. (2015). Management of solid wastes from steelmaking and galvanizing processes: A brief review. *Resources, Conservation and Recycling* 102, 49–57.
- Cano, A.M. & Cano, J.D. (2008). Mejoramiento en el manejo de los residuos sólidos en una industria metalmecánica. *Producción + Limpia*, Vol. 3, N° 1.
- Capdevielle, F., Ottati, C. & Lopretti, M. (2010). Bioinfo\_eXtrema: un enfoque bioinformático para integrar información ambiental, bioquímica y genómica, enfocado en bioprospección y selección de consorcios de microorganismos con aplicaciones en biorremediación. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay* N° 5.
- Castiglioni, G. & Costa, J. (2015). Production of lipase by *Aspergillus fumigatus* in Solid State Fermentation using residues from rice. *Agrociencia* Vol. 19, (1-7).
- CCMPC: Cámara de Comercio de Manizales por Caldas. (2013). ¿Por qué invertir en metalmecánica en Manizales? Recuperado el 12 de diciembre de 2015 de [http://www.ccmpec.org.co/ccm/proyectos/?Pages\\_Id=222](http://www.ccmpec.org.co/ccm/proyectos/?Pages_Id=222)
- CCMPC: Cámara de Comercio de Manizales por Caldas. (2015). Informe Económico 2014 Colombia y Caldas. Área de Investigaciones Socioeconómicas. Recuperado el 12 de diciembre de 2015 de [http://ccmpec.org.co/ccm/contenidos/49/Informe Economico 2014.pdf](http://ccmpec.org.co/ccm/contenidos/49/Informe_Economico_2014.pdf)
- Cervantes, E., Salazar, L., Díaz, P. (2013). Lipasas inducidas por hidrocarburos del petróleo. *Revista Int. Contaminación Ambiental* 29 (9-15).
- Chen, M., Xua, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D. & Zhang, J. (2015) Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavymetals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances* 33, (745–755).

CIMIC - Centro de Investigaciones Microbiológicas (2007). Consultado el 3 de enero de 2016 en <http://cimic.uniandes.edu.co/publicaciones.htm#landfarming>.

Colombia, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial /OCADE. (2007). Gestión integral de residuos o desechos peligrosos. Bases conceptuales, Bogotá, Colombia. Recuperado el 15 de diciembre de 2015 de [https://www.minambiente.gov.co/images/AsuntosambientalesySectorialyUrbana/pdf/sustancias\\_qu%C3%ADmicas\\_y\\_residuos\\_peligrosos/gestion\\_integral\\_respel\\_bases\\_conceptuales.pdf](https://www.minambiente.gov.co/images/AsuntosambientalesySectorialyUrbana/pdf/sustancias_qu%C3%ADmicas_y_residuos_peligrosos/gestion_integral_respel_bases_conceptuales.pdf).

Cornelis, P. (2008). *Pseudomonas, genomics and molecular biology*. Caister academic press.

Cronje, G., Beeharry, A., Wentzel, M., & Ekama, G. (2002). Active biomass in activated sludge mixed liquor. *Water Research*, 439-444.

DANE Censo 2005 (2005). Contexto sectorial, Manizales, Caldas. Recuperado el 11 de diciembre de 2015 de [https://www.google.com.co/search?q=CONTEXTO+SECTORIAL+MANIZALES+%E2%80%93+CALDAS&oq=CONTEXTO+SECTORIAL+MANIZALES+%E2%80%93+CALDAS&aqs=chrome..69i57.338j0j7&sourceid=chrome&es\\_sm=93&ie=UTF-8#](https://www.google.com.co/search?q=CONTEXTO+SECTORIAL+MANIZALES+%E2%80%93+CALDAS&oq=CONTEXTO+SECTORIAL+MANIZALES+%E2%80%93+CALDAS&aqs=chrome..69i57.338j0j7&sourceid=chrome&es_sm=93&ie=UTF-8#)

DANE. (2015). Informe de Coyuntura Económica Regional (ICER), Departamento de Caldas 2014. Recuperado el 10 de diciembre de 2015 de [https://www.dane.gov.co/files/icer/2014/ICER\\_Caldas2014.pdf](https://www.dane.gov.co/files/icer/2014/ICER_Caldas2014.pdf).

DANE. (2015). Estadísticas de exportaciones. Recuperado el 12 de diciembre de 2015 de <http://www.dane.gov.co/index.php/comercio-y-servicios/comercio-exterior/exportaciones>.

Das, D., Baruah, R., Roy, A., Singh, A., Boruah, H., Kalita, J. & Bora, T. (2015). Complete genome sequence analysis of *Pseudomonas aeruginosa* N002 reveals its genetic adaptation for crude oil degradation. *Genomics* 105, (182–190).

Das, S. & Dash, H. (2014). 1. Microbial Bioremediation: A Potential Tool for Restoration of Contaminated Areas. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Versión electrónica:

<https://books.google.com.co/books?id=NNnEAgAAQBAJ&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>

Decreto 1076 de 2015. Recuperado el 12 de Febrero de 2016 de [https://www.minambiente.gov.co/images/Atencion\\_y\\_participacion\\_al\\_ciudadano/consultas\\_publicas\\_2015/juridica/Proyecto\\_de\\_Decreto\\_7\\_5\\_15.pdf](https://www.minambiente.gov.co/images/Atencion_y_participacion_al_ciudadano/consultas_publicas_2015/juridica/Proyecto_de_Decreto_7_5_15.pdf)

Decreto 2981 de 2013. Recuperado el 11 de diciembre de 2015 de <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=56035#120>

Decreto 3930 de 2010. Recuperado el 18 de agosto de 2014, de <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=40620>

Decreto 4728 de 2010. Recuperado el 18 de agosto de 2014 de [https://www.minambiente.gov.co/images/normativa/decretos/2010/dec\\_4728\\_2010.pdf](https://www.minambiente.gov.co/images/normativa/decretos/2010/dec_4728_2010.pdf)

Decreto 4741 de 2005. Recuperado el 18 de agosto de 2014, de <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=18718>

Decreto-Ley 2811 de 1974. Recuperado el 12 de Febrero de 2016 de <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=1551>

DESCONT: Gestión ambiental de residuos. (2014).Página WEB empresarial consultada el 12 de diciembre de 2015 en <http://www.descont.com.co/tratamiento.html#>

Durand, A. (2003) Bioreactor designs for solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal 13 (113–125).

Equipo editorial Buenos Negocios. (2013). 6 Razones para certificar normas de calidad. Consultado el 12 de diciembre de 2015 <http://www.buenosnegocios.com/notas/558-6-razones-certificar-normas-calidad>.

Fernández, A., García de la Fuente, C., Sáez, J., Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica.

- Ferrer, J. & Martínez, J. (2007). Responsabilidad ecológica de las empresas del sector metalmeccánico oferentes de servicios a la industria petrolera. MULTICIENCIAS, Vol. 7, Nº 1, (17 - 25).
- Ferrera-Cerrato, R., Rojas, N.; Poggi, H., Alarcón, A., & Cañizares, R. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. Revista Latinoamericana de Biotecnología, 179-187.
- Flores, Y.; Velasco, M.; Beltrán, M.; Vaca, M.; Vázquez, A. (2006). Reuso de residuos de la industria metal-mecánica para el tratamiento de efluentes que contienen contaminantes reducibles. Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: investigación, desarrollo y práctica, Vol. 1, Nº 1.
- Fundación entorno, empresa y medio ambiente. (1998). Informe medioambiental del sector metalmeccánico. España. Recuperado el 10 de diciembre de 2015 de [http://www.bizkaia21.eus/biblioteca\\_virtual/descargar\\_documento.asp?idDoc=877&idSubArea=1&idPagina=124&volver=3&idioma=eu&pag=4&orden=2&tipoOrden=1](http://www.bizkaia21.eus/biblioteca_virtual/descargar_documento.asp?idDoc=877&idSubArea=1&idPagina=124&volver=3&idioma=eu&pag=4&orden=2&tipoOrden=1)
- GilPavas, E., Rojas, V. & Casas D. (2011). Procesos avanzados de oxidación para el tratamiento de residuos líquidos peligrosos procedentes de los laboratorios de Ingeniería de Procesos. Cuaderno de Investigación No 88. Universidad EAFIT Medellín, Colombia.
- Gómez, S., Gutiérrez, D., Hernández, A., Hernández, C., Losada, M. & mantilla, P. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. NOVA - Publicación Científica en ciencias biomédicas. Vol.6, Nº 9.
- González, D., Amaíz, L., Medina, L., Vargas, R., Izzeddin, N. & Valbuena, O. (2012). Biodegradación de residuo graso industrial empleando bacterias endógenas. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal 3(2):105-118.
- González, E. (2011). Concepto y estrategias de biorremediación. IngeedUAN. Vol. 1, Nº1.

- Hasan, F., Shah, A., Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* 27 (782–798).
- Henríquez, C., Uribe, L., Valenciano, A., Nogales, R. (2014). Actividad enzimática del suelo -Deshidrogenasa,  $\beta$ -glucosidasa, fosfatasa y ureasa- bajo diferentes cultivos. *Agronomía Costarricense* 38, (43-54).
- HiMedia Lab: Bushnell Haas Agar M349. Recuperado el 18 de marzo de 2015 de <http://himedialabs.com/TD/M349.pdf>
- Himmelblau, E. (2001). Optimization of chemical processes. McGraw-Hill Chemical Engineering Series. Segunda edición.
- ICFES (1991) Módulo ambiental para el desempeño en Ingeniería Química. Recuperado el 13 de diciembre de 2015 de [https://www.google.com.co/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&es\\_th=1&ie=UTF-8#](https://www.google.com.co/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&es_th=1&ie=UTF-8#)
- IDEAM. (2011) Informe Nacional generación y manejo de residuos o desechos peligrosos en Colombia. Recuperado el 15 de diciembre de 2015 de [http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/022431/INFORME\\_NACIONALWEB.pdf](http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/022431/INFORME_NACIONALWEB.pdf).
- INCOLMA INVERMEC S.A. (2014). Presentación Residuos generados de actividades metalmecánicas. Gestión Ambiental. Manizales, Caldas.
- Industrias Metálicas Miller. (2014). Crecimiento de la industria metalmecánica en Colombia. Recuperado el 10 de diciembre de 2015 de <http://www.immiller.com/noticias/108-crecimiento-de-la-industria-metalmecanica-en-colombia.html>.
- IQA. (2014). Caracterización Residuos de Vibrado INCOLMA. Manizales.
- Izquierdo, A. (2013). Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales. Universidad de Barcelona, España.



- Jiménez, D., Medina, S. & Gracida, J. (2010) Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, Vol. 26, N° 1, (65-84).
- Jirků, V., Cejková, A., Schreiberová, O., Jezdík, R. & Masák, J. (2015). Multicomponent biosurfactants - A "Green Toolbox" extension. *Biotechnology Advances*. Article in press.
- Jorgensen, K., Puustinen, K., & Suortti, M. (2000). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, 245-254.
- Joshi, C. & Khare, S. (2013). Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* lipase produced by SSF of deoiled *Jatropha* seed cake. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (32–37).
- Juwarkar, A. (2012). Microbe-assisted phytoremediation for restoration of biodiversity of degraded lands: A sustainable solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, Vol. 82, Supplement 2, (313-318).
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Consultado el 6 de enero de 2016 de [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?org\\_name=pae&mapno=00071&mapscale=&show\\_description=hide](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=pae&mapno=00071&mapscale=&show_description=hide).
- Khan, F., Husain, T., & Hejazi, R. (2004). An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*, 95-122.
- La Opinión. (2014). Consultado el 11 de diciembre de 2015 de <http://www.laopinion.com.co/colombia-genera-180000-toneladas-de-residuos-peligrosos-cada-o-83130#ATHS>
- Lee, S-H., Lee, S., Kimc, D-Y. & Kimc, J. (2007). Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. *Journal of Hazardous Materials* 143, (65–72).
- Lehnert, R. (1979). *La construcción de herramientas*. Edición en español. Editorial Reverté. España. (251-265).

Ley 9° de 1979, Código Sanitario Nacional. Recuperado el 12 de Febrero de 2016 de <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=1177>

López, L. (2004). Dinámica de los factores sociales y culturales que influyen en la consolidación del microcluster de herramientas de Caldas. Universidad Nacional de Colombia. Manizales, Colombia.

López, W (2010). Estudio del uso de residuos industriales no peligrosos a través del proceso de compostaje y su aplicación para el cultivo de maíz y frijol. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Tlaxcala, México.

Lladó, S. (2012). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas. España: Universidad de Barcelona.

Lladó, S., Solanas, A.M., de Lapuente, J., Borràs, M. & Viñas, M. (2012). A diversified approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation strategies for heavy-oil-contaminated soil.

Mantilla, J. R., & Ruíz, G. A. (2008). Viabilidad técnica y económica del compostaje como tratamiento de estabilización de la pollinaza y gallinaza generada por la explotación avícola en la Mesa de Jéridas del municipio de Piedecuesta, departamento de Santander. Colombia.

Marca Colombia (2014). 8 Avances de la industria metalmecánica en Colombia. Recuperado el 11 de diciembre de 2015 de <http://www.colombia.co/exportaciones/8-avances-de-la-industria-metalmecanica-en-colombia.html>.

Marín, C. (2009). Administrar Mejor sus Residuos, Minimiza el Impacto Ambiental y Evita Sanciones. Revista Metal Actual. Edición N° 14, (50-57). Recuperado el 15 de agosto de 2014 de [http://www.metalactual.com/revista/14/Residuos\\_Peligrosos.pdf](http://www.metalactual.com/revista/14/Residuos_Peligrosos.pdf)

Marín, C. (2015). Gestión de residuos peligrosos, un compromiso de toda la industria. Revista Metal actual. Edición N° 38, (36-41). Recuperado el 10 de diciembre de 2015 de [http://www.metalactual.com/revista/38\\_36\\_procesos\\_residuos.pdf](http://www.metalactual.com/revista/38_36_procesos_residuos.pdf).

- Martínez, J. (2005). Guía para la gestión integral de residuos peligrosos. Fundamentos, Tomo I. Centro coordinador del convenio de Basilea para América Latina y el Caribe. Montevideo, Uruguay.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*, 1362-1375.
- Mehta, C., Palni, U., Franke-Wittle, H., & Sharma, A. (2014). Compost: Its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant disease. *Waste Management*, 607-622.
- Mendes de Paula, G. (2012). Cadena metalmeccánica en América Latina: importancia económica, oportunidades y amenazas. Asociación Latinoamericana del Acero (ALACERO). Recuperado el 15 de agosto de 2014 de <http://www.andi.com.co/cpa/Documents/CADENA%20METALMECANICA%20EN%20AMERICA%20LATINA%202012.pdf>.
- Menendez-Vega, D., Gallego, J., Peláez, A., Fernández de Córdoba, G., Moreno, J., Muñoz, D. & Sánchez, J. (2007). Engineered *in situ* bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology* 43, (310-321).
- Menezes, F., de Oliveira, F., Okeke, B. & Frankenberger-Júnior, W. (2003). Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology* 34, (65-68).
- Moreno, J., & Moral, R. (2007). Compostaje. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España (12-13).
- Narváez-Flórez, S., Gómez, M., & Martínez, M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos a partir de sedimentos del Caribe colombiano. *Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR*, 63-77.
- Neethu, C., Rahiman, K., Rosmine, E., Saramma, A., Hatha, A. (2015). Utilization of agro-industrial wastes for the production of lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Arctic and optimization of physical parameters. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (703-709).

Negro, M. (2000). Producción y gestión del compost. Zaragoza: Centro de técnicas agrarias. España.

Norma Técnica Colombiana GTC 24 de 2009. Recuperado el 11 de diciembre de 2015 de <http://www.estra.com/eco/pdf/norma.pdf>.

Novo, M. (2009). La educación ambiental: una genuina educación para el desarrollo sostenible. Revista de Educación, número extraordinario, pp. 195-217.

Okkotsu, Y., Little, A. & Schurr, M. (2014). The *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component system coordinates multiple phenotypes. *Frontiers in cellular and infections microbiology*, 4(82). Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4064291/>.

Pardo, J., Perdomo, M. & Benavides, J. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. NOVA, Vol.2, Nº 2.

Pacwa-Ptocińczak, M., Ptaza, G., Piotrowska-Seget, Z. & Cameotra, S. (2013) Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences*. Nº. 12 , (633-654).

Peix, A., Ramírez-Bahena, M. & Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution* 9, (1132–1147).

Pérez, J. (2009). Los aceites lubricantes. Consultado el 19 de enero de 2016 de [www.educarm.es/templates/portal/ficheros/.../21/aceites\\_lubricantes.doc](http://www.educarm.es/templates/portal/ficheros/.../21/aceites_lubricantes.doc).

Petrikov, K., Delegan, Y., Surin, A., Ponamoreva, O., Puntus, I., Filonov, A., Boronin, A. (2013) Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure. *Process Biochemistry* 48 p. 931–935.

Piotrowska-Cyplik, A., Chrzanowski, L., Cyplik, P., Dach, J., Olejnik, A., Staninska, J., Czarny, J., Lewicki, A., Marecik, R. & Powierska-Czarny, J. (2013). Composting of oiled bleaching earth: Fatty acids degradation, phytotoxicity and mutagenicity changes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 78, (49-57).

Plan de desarrollo Manizales 2012-2015. Consultado el 13 de diciembre de 2015 de

<http://www.manizales.gov.co/RecursosAlcaldia/201505052131055709.pdf>

PNUD & DPS. (2014). Sector metalmecánico: Perfiles laborales y oportunidades de inclusión social en el corredor Duitama - Sogamoso de Boyacá. Primera Edición. Recuperado el 9 de diciembre de 2015 de <http://www.crepib.org.co/documentos/2014/publicaciones/Perfilessector metalmecanicoBoyaca.pdf>.

Portafolio.co. (2014) Empresa colombiana exporta un millón de machetes al mes. Recuperado el 9 de diciembre de 2015 de <http://www.portafolio.co/negocios/colombia-exportador-machetes>.

Portafolio.co. (2014) En Colombia, la producción es mucho menor a la demanda. Recuperado el 9 de diciembre de 2015 de <http://www.portafolio.co/negocios/especial-industria-siderurgica-colombia-0>.

PROEXPORT. (2013). Exportaciones de Caldas. Revista de las oportunidades. Recuperado el 22 de septiembre de 2015, de Clasificación Proexport: <http://www.procolombia.co/sites/default/files/caldas.pdf>

PROEXPORT. (2014). Exportaciones de Caldas. Revista de las oportunidades. Recuperado el 28 de mayo de 2016, de <http://www.procolombia.co/publicaciones/revista-de-oportunidades-caldas-2014>

PROPAIS. (2013). Estrategias de intervención para el sector metalmecánico. Recuperado el 10 de diciembre de 2015 de <http://propais.org.co/biblioteca/intervencion/diagnostico-del-sector-y-estrategias-de-intervencion-sectorial-metalmeccanica.pdf>.

Realp, E., Domenech, J., Martínez, R., Restrepo, C., Lladó, S., Viñas, M., y otros. (2008). Ensayo piloto de biorremediación por la tecnología de la biopila dinámica para la descontaminación de suelos contaminados por creosotas provenientes de las actividades dedicadas a la preparación de la madera. Revista Técnica de Residuos, 38-49.

- Riojas, H., Torres, L., Mondaca, I., Balderas, J. & Gortarés, P. (2010). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Química Viva*, N° 3.
- Robinson, T., Singh, D., Nigam, P. (2002). Fermentación en estado sólido: una tecnología microbiana promisorio para la producción de metabolitos secundarios. *Vitae*, Vol. 9, N° 2, (27-36).
- Rodríguez, E., Kalks, K., Tótola, M. (2015). Prospect, isolation, and characterization of microorganisms for potential use in cases of oil bioremediation along the coast of Trindade Island, Brazil. *Journal of Environmental Management* 156, p.15-22.
- Rodríguez, E. (2011). Disposición final de la viruta metálica generada en las instituciones de educación superior. *Revista Gestión Integral en Ingeniería Neogranadina*. Vol. 3, N° 2.
- Rodríguez, Y. & Díaz, M. (2011). Evaluación del plan de manejo integral de residuos en el edificio de disciplinas agrícolas de Corpoica. Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, D.C., Colombia.
- Rozo, C. & Dussán, J. (2010). Análisis de transferencia horizontal de genes en ensayos de biorremediación con grasas recalcitrantes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. XII, N° 1, (22-31).
- Ruíz, H., Rodríguez, R., Rodríguez, R., Contreras, J. & Aguilar, C. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* Vol. 6, N° 1 (33-40).
- Sánchez, J. & Rodríguez, J. L. (2003). Biorremediación: Fundamentos y aspectos microbiológicos. *Industria y minería*, 12-16.
- Santis, A. (2013). Estudio de la producción de lipasas por fermentación en estado sólido a partir de residuos ricos en grasas. Impacto ambiental y posibles usos. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra, España.
- Sayara, T., Sarrà, M. & Sánchez, A. (2010) Effects of compost stability and contaminant concentration on the bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting. *Journal of Hazardous Materials* 179, (999–1006).

- Slabbinck, B., De Baets, B., Dawyndt, P. & Vos, P.D. (2010). Análisis de *Pseudomonas* fitopatógenas usando métodos inteligentes de aprendizaje: un enfoque general sobre taxonomía y análisis de ácidos grasos dentro del género *Pseudomonas*. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 28, Nº. 1, (1-16).
- Smith, R. (2005). Chemical Process Design and Integration. John Wiley & Sons Ltd. Segunda edición.
- Stamatakis, A. (2014). "RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies". In Bioinformatics, disponible en: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2014/01/21/bioinformatics.btu033.abstract?keytype=ref&ijkey=VTEqgUJYCDcf0kP>.
- Secretaría de ambiente (2010). Guía para la gestión y manejo integral de residuos de la industria metalmecánica. Recuperado el 12 de Agosto de 2014, de Secretaría de ambiente: [www.secretariadeambiente.gov.co](http://www.secretariadeambiente.gov.co).
- Semple, K., Reid, B., & Fermor, T. (2001). Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. Environmental Pollution, 269-283.
- SENA (2014) Sector metalmecánico: retos de cara al futuro. Manizales (Cal.), 14 de marzo de 2013 <http://periodico.sena.edu.co/productividad/noticia.php?t=sector-metalmecanico-retos-de-cara-al-futuro&i=868>.
- Severo, E., Ferro de Guimaraes, J., Henri, E., Hermann, C. (2015). Cleaner production, environmental sustainability and organizational performance: an empirical study in the Brazilian Metal-Mechanic industry. Journal of Cleaner Production, 96, 118-125.
- Singer, A., van der Gast, C. & Thompson, I. (2005). Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. Trends in Biotechnology Vol.23 Nº 2.
- Sitjes, J. (2003). Identificación, clasificación y minimización de residuos en el sector metal-mecánico. Recuperado el 12 de diciembre de 2015 de <http://www.interempresas.net/MetalMecanica/Articulos/8511-Identificacion-clasificacion-y-minimizacion-de-residuos-en-el-sector-metal-mecanico.html>.

- Sprocati, A., Alisi, C., Tasso, F., Marconi, P., Sciullo, A., Pinto, V., Chiavarini, S., Ubaldi, C. & Cremisini, C. (2012). Effectiveness of a microbial formula, as a bioaugmentation agent, tailored for bioremediation of diesel oil and heavy metal co-contaminated soil. *Process Biochemistry* 47, (1649–1655).
- Souza, E., Vessoni-Penna, T., Pinheiro, R. (2014). Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation* 89 (88-94).
- Stover, C., Pham, X., Erwin, A., Mizoguchi, S., Warrenner, P., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *NATURE*. Vol. 406.
- Taiwo, A.M., Gbadebo, A.M., Oyedepo, J.A., Ojekunle, Z.O., Alo, O.M., Oyeniran, A.A., Onalaja, O.J., Ogunjimi, D. & Taiwo, O.T. (2016) Bioremediation of industrially contaminated soil using compost and plant technology. *Journal of Hazardous Materials* 304, (166–172).
- Thangarajan, R., Adetutu, E., Moore, R., Ogunbanwo, S. & Ball, A. (2011). Comparison between different bio-treatments of a hydrocarbon contaminated soil from a landfill site. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10, (15151-15162).
- Thavasi, R., Jayalakshmi & S., Banat, I. (2011). Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. *Bioresource Technology*. 102, (3366–3372).
- Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A. (2013) Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 81 (146–161).
- Trade Map Org. (2014). Estadísticas del comercio para el desarrollo internacional de las empresas, datos comerciales mensuales, trimestrales y anuales. Recuperado el 11 de diciembre de 2015 de [http://www.trademap.org/Country\\_SelProduct.aspx](http://www.trademap.org/Country_SelProduct.aspx).
- Ullah, A., Heng, S., Hussain, M., Fahad, S. & Yang, X. (2015) Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environmental and Experimental Botany* 117, (28–40).
- UNESCO (2009). Memorias Taller Técnico "El Paisaje Cultural y su Territorio". Cátedra UNESCO - Gestión Integral del Patrimonio. Observatorio para la



sostenibilidad del patrimonio en paisajes culturales. Manizales, Colombia. Recuperado el 10 de diciembre de 2015 de <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/276/1/A68153.pdf>.

Universidad de Caldas. (2015). Informe N° 1803. Laboratorio de nutrición animal y vegetal. Manizales.

Universidad Nacional de Colombia. (2014). Informe de Ensayo LQIE-0083-2014. Manizales.

Universidad Nacional de Colombia. (2015). Informe de Ensayo LQIE-0075-2015. Manizales.

van de Lagemaat, J. & Pyle, D. (2001). Solid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. *Chemical Engineering Journal* 84 (115–123).

Vanguardia.com (2014). Colombia, el mayor exportador de machetes en el mundo. Recuperado el 14 de diciembre de 2015 de <http://www.vanguardia.com/economia/nacional/255964-colombia-el-mayor-exportador-de-machetes-en-el-mundo>.

Vallejo, V., Salgado, L. & Roldán, F. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la degradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 7, N° 2 (67-78).

Vargas, P., Cuéllar, R. & Dussán, J. (2004). Biorremediación de residuos del petróleo. *Hipótesis, Apuntes científicos Uniandinos* N° 4.

Vásquez, M., Guerrero, J., & Quintero, A. (2010). Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 141-157.

Velasco, J., & Volke, T. (2003). El composteo: una alternativa ecológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica*, 41-53.

Velosa, J. (2011). Aproximación de modelo metodológico sobre capacidad tecnológica para las pymes del sector metalmeccánico colombiano. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería, Bogotá D.C., Colombia.

- Volke, T. & Velasco, J. (2002) Tecnologías de remediación para suelos contaminados. INE-SEMARNAT México. 64 p.
- Wang, H., Wang, C., Lin, M., Sun, X., Wang, C., Hu, X. (2013) Phylogenetic diversity of bacterial communities associated with bioremediation of crude oil in microcosms. *International Biodeterioration & Biodegradation* No. 85 p. 400-406.
- Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Environmental biotechnology*, 237-241.
- Widdel, F. & Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 12 (259–276).
- Yong, Y., Wu, X., Sun, J., Cao, Y. & Song, H. (2014). Engineering quorum sensing signaling of *Pseudomonas* for enhanced wastewater treatment and electricity harvest: A review. *Chemosphere*. Article in press.