



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEGRADACIÓN DE ACEITES Y GRASAS MEDIANTE EL USO

DE *Aspergillus spp*, *Penicillium spp* Y *Fusarium spp*, EN AGUAS

RESIDUALES DE QUESERAS ARTESANALES DE QUIMIAG

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: VERÓNICA CRISTINA VERDEZOTO MONCAYO

TUTORA: ING. PAOLA CHILUIZA MSc.

Riobamba-Ecuador

2017

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **DEGRADACIÓN DE ACEITES Y GRASAS MEDIANTE EL USO DE *Aspergillus spp*, *Penicillium spp* Y *Fusarium spp*, EN AGUAS RESIDUALES DE QUESERAS ARTESANALES DE QUIMIAG**, de responsabilidad de la señorita Verónica Cristina Verdezoto Moncayo, ha sido minuciosamente revisado por los miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. Paola Cristina Chiluiza Ramos

DIRECTOR DE TRABAJO

DE TITULACIÓN

Dr. Gerardo Emilio Medina Ramírez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Verónica Cristina Verdezoto Moncayo soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Verónica Cristina Verdezoto Moncayo

DEDICATORIA

A mis padres Ramiro y Martha, a mis hermanos Carolina y Javier, a mi sobrino Gabriel y a todas las personas que me acompañaron a lo largo de mi vida estudiantil.

Verónica

AGRADECIMIENTO

A Dios y la Virgen Dolorosa que me han brindado sabiduría y fortaleza para culminar este trabajo, a mi familia por su constante apoyo y comprensión. A mis amigos, técnicos docentes, docentes de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y a todas las personas que de una u otra manera ayudaron a la realización de esta investigación muchas gracias.

Verónica

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xii
SUMMARY	xiii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1	MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	4
1.1	Antecedentes	4
1.2	Marco Conceptual.....	6
1.2.1	<i>Queseras artesanales</i>	6
1.2.2	<i>Producción de queso</i>	6
1.2.2.1	<i>Proceso productivo.....</i>	7
1.2.3	<i>Aguas residuales en la Industria Láctea</i>	8
1.2.3.1	<i>Composición general.....</i>	8
1.2.3.2	<i>Tratamiento de aguas residuales.....</i>	13
1.2.4	<i>Aceites y grasas</i>	15
1.2.4.1	<i>Triacilglicéridos</i>	15
1.2.4.2	<i>Aceites y grasas en el ambiente.....</i>	16
1.2.4.3	<i>Métodos de análisis de aceites y grasas</i>	18
1.2.5	<i>Microorganismos lipolíticos</i>	19
1.2.5.1	<i>Lipasas</i>	20
1.2.5.2	<i>Lípidos como nutrientes microbianos.....</i>	21
1.2.5.3	<i>Hongos lipolíticos.....</i>	22

CAPÍTULO II

2	MARCO METODOLÓGICO.....	26
2.1	Hipótesis y especificación de las variables	26

2.1.1	Hipótesis	26
2.1.2	Variables	26
2.1.2.1	<i>Variable dependiente</i>	26
2.1.2.2	<i>Variables Independientes</i>	26
2.2	Tipo y Diseño de Investigación	26
2.3	Unidad de análisis	27
2.4	Población de estudio	27
2.5	Tamaño de muestra	27
2.6	Selección de la muestra	27
2.7	Técnicas de recolección de datos	28
2.7.1	<i>Localización y descripción del lugar</i>	28
2.7.2	<i>Recolección de la muestra</i>	29
2.7.3	<i>Caracterización de parámetros físico-químicos y microbiológicos</i>	30
2.7.4	<i>Identificación macroscópica y microscópica</i>	31
2.7.5	<i>Determinación de actividad lipolítica</i>	32
2.7.5.1	<i>Preparación de medios de cultivo</i>	33
2.7.6	<i>Pruebas de antagonismo</i>	34
2.7.7	<i>Preparación del inóculo de Aspergillus spp, Penicillium spp y Fusarium spp</i>	35
2.7.7.1	<i>Inóculo de Aspergillus spp y Penicillium spp</i>	36
2.7.7.2	<i>Inóculo de Fusarium spp</i>	36
2.7.8	<i>Conteo de esporas</i>	36
2.7.9	<i>Inoculación del agua residual</i>	38
2.7.10	<i>Determinación de la eficiencia degradativa de aceites y grasas</i>	39
CAPÍTULO III		
3	MARCO DE RESULTADOS	42
3.1	Resultados, análisis y discusión	42
3.1.1	<i>Caracterización de parámetros físico-químicos y microbiológicos</i>	42
3.1.2	<i>Identificación macroscópica y microscópica</i>	45

3.1.2.1	<i>Género Penicillium</i>	45
3.1.2.2	<i>Género Aspergillus</i>	46
3.1.2.3	<i>Género Fusarium</i>	47
3.1.3	<i>Determinación de actividad lipolítica</i>	49
3.1.4	<i>Pruebas de antagonismo</i>	50
3.1.5	<i>Preparación del inóculo de Aspergillus spp, Penicillium spp y Fusarium spp</i>	52
3.1.6	<i>Conteo de esporas</i>	53
3.1.7	<i>Eficiencia degradativa de aceites y grasas</i>	53
3.1.8	<i>Control crecimiento microbiano</i>	59
3.1.9	<i>Análisis adicionales</i>	60
	CONCLUSIONES	68
	RECOMENDACIONES	69
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Proceso productivo para la elaboración de quesos y aspectos medioambientales... 7	7
Tabla 2-1: Composición de aguas residuales generadas en la producción de queso. 9	9
Tabla 3-1: Sólidos presentes en aguas. 10	10
Tabla 1-2: Diseño experimental..... 27	27
Tabla 2-2: Análisis físico-químicos y microbiológicos 31	31
Tabla 3-2: Composición del Agar base Tributirina con mantequilla 33	33
Tabla 4-2: Composición del Caldo Mínimo 33	33
Tabla 5-2: Composición del Agar Aceite de Oliva..... 34	34
Tabla 6-2: Preparación del Caldo Papa y Dextrosa 36	36
Tabla 1-3: Caracterización física-química y microbiológica del agua residual 42	42
Tabla 2-3: Matriz de componentes rotados ^a 44	44
Tabla 3-3: Resultados conteo de esporas 53	53
Tabla 4-3: Pruebas de los efectos inter-sujetos 54	54
Tabla 5-3: Subconjuntos homogéneos para aceites y grasas respecto a los tratamientos 55	55
Tabla 6-3: Subconjuntos homogéneos para aceites y grasas (mg/l) respecto al tiempo 56	56
Tabla 7-3: Crecimiento de hongos en las unidades experimentales..... 59	59
Tabla 8-3: Prueba ANOVA para DBO ₅ 60	60
Tabla 9-3: Prueba ANOVA para DQO 61	61
Tabla 10-3: Prueba ANOVA para sólidos totales 63	63
Tabla 11-3: Prueba ANOVA para sólidos suspendidos 65	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Mecanismo general de oxidación de lípidos	17
Figura 2-1: Reacciones de la digestión anaeróbica.....	18
Figura 3-1: Mecanismo de β -oxidación de ácido grasos	22
Figura 4-1: <i>A. flavus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. terreus</i>	23
Figura 5-1: <i>Penicillium</i> spp.....	24
Figura 6-1: <i>Fusarium</i> spp	25
Figura 1-2: Metodología de pruebas de antagonismo.....	35
Figura 2-2: Cámara de Neubauer.....	37
Figura 1-3: Cultivo hongo <i>Penicillium</i> spp.....	45
Figura 2-3: <i>Penicillium</i> spp al microscopio	45
Figura 3-3: <i>Penicillium digitatum</i>	46
Figura 4-3: Cultivo hongo <i>Aspergillus</i> spp.....	46
Figura 5-3: <i>Aspergillus</i> spp al microscopio	47
Figura 6-3: <i>Aspergillus flavus</i>	47
Figura 7-3: Cultivo hongo <i>Fusarium</i> spp	48
Figura 8-3: <i>Fusarium</i> spp al microscopio.....	48
Figura 9-3: <i>Fusarium oxysporum</i>	49
Figura 10-3: Pruebas de antagonismo.....	51
Figura 11-3: Masificación de <i>Aspergillus</i> spp y <i>Penicillium</i> spp	52
Figura 12-3: Masificación de <i>Fusarium</i> spp.....	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Concentración de aceites y grasas vs Tratamientos aplicados	56
Gráfico 2-3: Concentración de aceites y grasas vs Tiempo	57
Gráfico 3-3: Reducción de aceites y grasas en el agua residual.....	58
Gráfico 4-3: DBO ₅ vs Tratamientos aplicados.....	61
Gráfico 5-3: DQO vs Tratamientos aplicados.....	62
Gráfico 6-3: Sólidos totales vs Tratamientos aplicados	64
Gráfico 7-3: Sólidos suspendidos vs Tratamientos aplicados.....	66
Gráfico 8-3: Conductividad vs Tratamientos aplicados.....	67

RESUMEN

Se evaluó la capacidad de tres especies de hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* para reducir aceites y grasas en aguas residuales generadas en la producción de quesos artesanales. Se aplicaron cuatro tratamientos: A (*Aspergillus spp* + Agua residual [AR]), P (*Penicillium spp* + AR), F (*Fusarium spp* + AR), M (*Aspergillus spp* + *Penicillium spp* + *Fusarium spp* + AR), y un control con agua residual sin inoculación de esporas. Las soluciones de esporas se inocularon ajustando una concentración inicial de 1×10^6 esporas/ml en los tratamientos *Aspergillus spp* y *Penicillium spp* y de 1×10^4 esporas/ml en *Fusarium spp*. Cada tratamiento se realizó por triplicado, el tiempo de experimentación fue de 17 días controlándose la concentración de aceites y grasas a los 3, 5, 10 y 17 días. Al término de la experimentación se midieron además: DBO₅, DQO, sólidos suspendidos y sólidos totales. Los tratamientos A, P, F y M redujeron los aceites y grasas en un 73%, 72%, 41% y 87% respectivamente, mostrándose que el tratamiento Mixto (M) causó mayor reducción de aceites y grasas. Se concluye que el uso de estos microorganismos representa una alternativa viable para el tratamiento de aguas residuales originadas en la industria láctea y se recomienda continuar con investigaciones que permitan el uso de estos hongos en etapas de pretratamiento de aguas con alto contenido graso.

Palabras clave: <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES>, <PARTICIÓN GRAVIMÉTRICA>, <ACEITES Y GRASAS>, < HONGO (*Aspergillus*)>, < HONGO (*Penicillium*)>, < HONGO (*Fusarium*)>.

SUMMARY

The capacity of three species of fungi belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* was evaluated to reduce oils and fat in wastewater generated in the production of artisan cheeses. Four treatments were applied: A (*Aspergillus* spp + Residual water [RW]), P (*Penicillium* spp + RW), F (*Fusarium* spp + RW), M (*Aspergillus* spp + *Penicillium* spp + *Fusarium* spp + RW), and a control with residual water without inoculation of spores. The spore solutions were inoculated by adjusting an initial concentration of 1×10^6 spores/ml in *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp treatments and 1×10^4 spores / ml in *Fusarium* spp. Each treatment was performed in triplicate, the experimental time was 17 days, controlling the concentration of oils and fats at 3, 5, 10 and 17 days. At the end of the experimentation were also measured: BOD₅ COD, suspended solids and total solids. The treatments A, P, F and M reduced the oils and fat by 73%, 72%, 41% and 87% respectively, showing that the Mixed (M) treatment caused greater reduction of oils and fats. It is concluded that the use of these microorganisms represents a viable alternative for the treatment of wastewater originating in the dairy industry and it is recommended to continue with investigations that allow the use of these fungi in stages of pretreatment of waters with high fat content.

Keywords: <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <WASTEWATER TREATMENT>, <GRAVIMETRIC PARTITION>, <OILS AND FATS>, <FUNGUS (*Aspergillus*)>, <FUNGUS (*Penicillium*)>, <FUNGUS (*Fusarium*)>.

INTRODUCCIÓN

Identificación del Problema

En los últimos años, las queserías, se han consolidado como pequeñas y medianas empresas especializadas en la producción de queso como consecuencia del incremento de la demanda de este producto a nivel nacional. Se estima que en el país, la industria láctea procesa 5,8 millones de litros de leche al día, de los cuales más de un tercio se destina a la elaboración de quesos (Orozco, 2015).

Los procesos de la industria láctea consumen volúmenes significativos de agua generando gran cantidad de residuos líquidos con alta carga orgánica. A nivel general, por cada litro de leche procesada se emplean entre 0,5L a 3L de agua. De todo el sector lácteo, la elaboración de quesos es el proceso más contaminante por la generación de lactosuero (proteínas, lactosa, minerales, vitaminas y grasas) y por el alto consumo de agua, siendo necesario 10% de leche y 90% de agua para su elaboración generando de 2L a 4L de agua residual por cada litro de leche (Magro, 2011; Parra, 2009).

La composición de efluentes de la industria láctea se caracteriza por un alto contenido de grasas, lactosa y proteínas. El agua descargada modifica la apariencia de la fuente receptora, siendo uno de los cambios observables la presencia de natas en la superficie del líquido (Condorchem Envitech, 2015), estas interfieren con el intercambio de gases entre el agua y la atmósfera debido a que estas sustancias poseen baja densidad, poca solubilidad en agua y baja o nula degradabilidad, además interfieren con la penetración de la luz solar y en los niveles de oxígeno disuelto del cuerpo receptor (Topanta, 2009).

La mayoría de tratamientos para aceites y grasas consisten en procesos físico químicos, sin embargo el tratamiento con organismos vivos se presenta como una alternativa viable aunque poco investigada, estos tratamientos presentan mayor eficiencia en degradación de materia orgánica y brindan un funcionamiento estable y control más sencillo de los procesos usados en los tratamientos.

Se plantea como pregunta central del problema:

¿Qué tratamiento biológico con hongos es efectivo para disminuir la cantidad de aceites y grasas en las aguas residuales de las Queseras Artesanales de Quimiag?

Justificación

Los aceites y grasas son inmiscibles con el agua y al mezclarse forman una película superficial impermeable sobre los cuerpos hídricos donde son vertidos. Ello genera condiciones anaeróbicas que evitan el ingreso y disolución del oxígeno provocando que la vida aeróbica desaparezca (Mendoza, 2010).

El tratamiento para aceites y grasas comúnmente usado en aguas residuales consiste en un método físico donde las grasas y aceites son retenidos en estructuras especializadas para tal fin, en estas se produce una separación de las grasas lo que permite su recolección y posterior disposición final, sin embargo, este método únicamente permite la separación de estos componentes para evitar que interfieran en procesos posteriores, sin llevarse a su degradación. El uso de tratamientos biológicos se presenta como una alternativa eficiente para tratar estos contaminantes, y brindan la posibilidad de degradarlos ayudando a la reducción de la contaminación, el mejoramiento de la calidad de las aguas receptoras y disminuyendo la acumulación de aceites y grasas en el ambiente.

Estudios realizados con hongos lipolíticos demuestran su eficacia para descomponer triacilglicéridos. Los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* son conocidos por producir en gran cantidad lipasas, las enzimas encargadas de catalizar la hidrólisis de aceites y grasas.

El estudio de tratamientos biológicos para la reducción de aceites y grasas en aguas residuales de plantas procesadoras de lácteos aporta a la generación de nuevos conocimientos y a la posibilidad de aplicarlos en pequeñas plantas de tratamiento para mejorar su eficiencia, disminuyendo costos al eliminar procesos preliminares, facilitando el mantenimiento de la planta y mejorando el porcentaje de degradación de materia orgánica.

OBJETIVOS

Objetivo General

Degradar aceites y grasas mediante el uso de *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp y *Fusarium* spp, en aguas residuales de Queseras Artesanales de Quimiag.

Objetivos Específicos

- Caracterizar físico-química y microbiológicamente el agua residual de las Queseras Artesanales de Quimiag.
- Formular las unidades experimentales con los hongos *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp y *Fusarium* spp.
- Determinar la degradación de aceites y grasas en los tratamientos aplicados.

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Antecedentes

El área de aceites y grasas ha sido de mucho interés investigativo principalmente como fuente de estudio de microorganismos capaces de crecer en muestras con estos contaminantes y su capacidad para actuar como potenciales agentes biorremediadores.

Flores, García y Quirasco (2003) aislaron e identificaron microorganismos lipolíticos a partir de una variedad de queso. De seis muestras tomadas tres presentaron crecimiento microbiano, de estas, se consideraron 13 colonias (que fueron las que mayor actividad lipolítica presentaron) para su identificación. Una vez identificadas se determinó que dos colonias eran levaduras de los géneros *Yarrowia* y *Candida* mientras que el resto pertenecían a bacterias de los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus*.

Mendoza et al (2014) seleccionaron cepas de hongos que presentaban mayor actividad lipolítica sobre aceite de higuera. Aislaron nueve cepas de hongos, de las cuales, ocho correspondieron al género *Penicillium* y una al género *Aspergillus*. Estas cepas presentaron un buen crecimiento sobre medios enriquecidos con aceite y buena actividad de hidrólisis sobre placas con triacilglicéridos de cadena corta.

Mendoza (2010) realizó el aislamiento y selección de hongos lipolíticos a partir de aceites vegetales de desecho. En esta investigación se tomó como base de estudio los microorganismos capaces de crecer en aceites vegetales de desecho los mismos que fueron aislados de 6 muestras de aceite usado en frituras, dando como resultado el aislamiento de 123 cepas, de las cuales 105 dieron positivo a la prueba para hongos lipolíticos. Las cepas aisladas pertenecen a los géneros

Penicillium, *Aspergillus* y *Geotrichum* géneros conocidos como buenos productores de lipasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de aceites y grasas.

Rodríguez (2011) aisló e identificó bacterias y hongos en muestras de agua residual tomadas de extractoras de palma aceitera en la zona de Quinindé, los que posteriormente fueron usados para probar su capacidad de degradación de la carga orgánica presente en las mismas. Las especies identificadas fueron dos cepas de *Fusarium*, una de *Aspergillus* y de *Brevundimonas*. Con las pruebas realizadas obtuvieron resultados positivos en la reducción de materia orgánica en las aguas residuales.

Castillo (2013) realizó la evaluación de la actividad lipolítica de aislamientos de *Fusarium* spp sobre distintas fuentes de lípidos, obteniendo como resultado mayor actividad fosfolipasa de *F. oxysporum*, actividad fosfolipasa y esterasa de *F. solani* y actividad lipolítica en margarinas y mantequillas de *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. verticillioides* siendo *F. solani* la especie que presentó mayor actividad lipolítica en los sustratos evaluados.

En una investigación realizada por Berrio et al. (2001) con el objetivo de estudiar la producción y caracterización de lipasas, se investigaron 12 microorganismos productores de lipasas entre cepas de bacterias, hongos y levaduras que fueron cultivadas en aceite de oliva 2% como fuente de carbono. La actividad lipolítica expresada por hongos alcanzó niveles mayores a la expresada por bacterias y levaduras siendo entre 5,4 y 2,8 mayor. *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* fueron los hongos que mejor producción de lipasas presentaron, *A. niger* sobre aceite de oliva, coco y girasol y *A. fumigatus* sobre aceite de oliva. La ventaja que presentan estos hongos es que son generalmente reconocidos como seguros (GRAS).

Rosas (2015) aisló y caracterizó una cepa de un hongo silvestre productor de lipasas extracelulares. Después de un periodo de observación y crecimiento se observó la actividad lipolítica del mismo y por microcultivo se confirmó que el hongo pertenecía al género *Penicillium*.

Con base en estos estudios es necesario comprobar la eficiencia los géneros de microorganismos mencionados en aguas residuales ricas en aceites y grasas producidas principalmente en la elaboración de quesos y otros derivados lácteos.

1.2 Marco Conceptual

1.2.1 Queseras artesanales

Se toma a una actividad como artesanal cuando el producto final no corresponde a producción industrial, mecanizada o en grandes series. Se puede definir a una quesera artesanal tomando en cuenta varios criterios: el criterio cuantitativo señala como elaboración artesanal de quesos cuando el proceso es manual y se trabaja con volúmenes de leche no mayores a 500L o 1000L diarios, el criterio cualitativo hace referencia a la materia prima usada, siendo aceptados como artesanales aquellos producidos únicamente con leche cruda, cuajo y sal. Una tercera vía indica como quesos artesanales a aquellos producidos por los mismos ganaderos dentro de sus propiedades (B. Fernández y F. Fernández, s.f.)

Fernández et al. (s.f.) menciona que al concepto de queseras artesanales se acompañan las siguientes características:

- Integración de una o varias explotaciones ganaderas.
- Limitación de las cantidades producidas.
- Ausencia de ciertos procesos industriales como clarificación de la leche, homogenización o pasteurización por placas.
- Ausencia de aditivos o espesantes excepto cuajo, sal y fermentos lácticos.

1.2.2 Producción de queso

El queso es un producto elaborado con leche, se forma por coagulación de las proteínas de la leche por aplicación del cuajo (enzima que desestabiliza a la caseína). Para acelerar la coagulación pueden añadirse otras enzimas o sustancias acidificantes. Después se moldea, se sala, se prensa y en algunos tipos de queso se siembra con cultivos bacterianos o fúngicos. El producto puede consumirse fresco o en distintos grados de maduración. (Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia [CAR/PL], 2002).

1.2.2.1 Proceso productivo

Según el CAR/PL (2002) para el proceso de elaboración de quesos, la leche debe ser tratada para acondicionar sus características físicas, químicas y biológicas, una vez lista la leche se procede a la etapa de coagulación donde se la lleva a una temperatura adecuada y se añaden enzimas para que se formen coágulos. Terminada la coagulación se corta la cuajada en pequeños cubos para favorecer el desuerado.

Se separa el suero y se introduce la cuajada en moldes. Estabilizada la masa, se sala y dependiendo del tipo de queso (fresco o maduro) se envasa o se deja para su maduración. Las distintas etapas del proceso se explican en la Tabla 1-1.

Tabla 1-1: Proceso productivo para la elaboración de quesos y aspectos medioambientales.

Operación	Descripción	Aspecto medioambiental
Coagulación	Precipitación de la caseína formando una masa gelatinosa que engloba a todos los componentes de la leche, puede ser ácida, enzimática o mixta.	Derrames de leche Consumo de energía térmica.
Corte y desuerado	Consiste en la separación del gel formado en la etapa anterior debido a la presencia de lactosuero.	Vertido de lactosuero
Moldeo y prensado	Verter en moldes los trozos de la cuajada para dar forma a la masa del queso. Con el prensado se favorece a la eliminación del lactosuero y mejora la consistencia del producto final.	Vertido de lactosuero
Salado	Adición de sal de acuerdo al tipo de queso a producirse para darle al producto el sabor deseado.	Consumo de agua para la salmuera. Vertido de salmuera.
Secado y maduración	Se expone al producto a una corriente de aire para que se seque su superficie y se lleva a las salas de maduración donde se controla la temperatura y humedad.	Consumo de energía.

Fuente: CAR/PL, 2002.

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

1.2.3 Aguas residuales en la Industria Láctea

El problema medioambiental más importante de la industria láctea es la generación de aguas residuales con alto contenido de carga orgánica. Los residuos líquidos generados por pérdidas de producto, lactosuero, fermentos, salmuera y por actividades de limpieza se caracterizan por tener pH extremos, alto contenido de DBO, DQO, sólidos en suspensión, aceites y grasas; así como nitrógeno, fósforo, cloruros y variaciones en las características físicas, los valores promedio de los efluentes se muestran en la Tabla 2-1. Se estima que solo en las fases de limpieza y proceso se generan de 0,8L a 1,5L de aguas residuales por litro de leche procesada (AEMA, 2014).

La mayor parte del agua usada en el proceso se convierte en agua residual, el agua se usa principalmente en la producción, enfriamiento, operaciones de limpieza y usos sanitarios. Toda el agua usada es finalmente desechada ya que no se incorpora en el producto final. La cantidad de agua residual generada depende del tipo de producto elaborado y el tipo de proceso productivo. Se habla de un vertido total de 1,5 a 2,5 litros de agua por cada litro de leche usada (EOI, 2008, p. 8).

1.2.3.1 Composición general

Generalmente, las aguas residuales proceden de la limpieza de equipos y superficies, aguas de enfriamiento junto a restos de leche y lactosuero. Si la red de drenaje es unitaria, las aguas se mezclan con el agua de lluvia dando como resultado la modificación de su composición. La composición del agua residual depende del tipo de producto, nivel de producción y la tecnología empleada para su producción. A nivel general, las aguas se caracterizan por contener una alta concentración de materia orgánica (DBO₅ y DQO), aceites y grasas, fósforo y nitratos así como alta biodegradabilidad, alta conductividad, presencia de sólidos en suspensión y valores de pH extremos (EOI, 2008, p. 9).

Para empresas de fabricación de queso, el agua cuenta también con lactosuero que eleva la carga contaminante. El lactosuero proviene de las operaciones de corte-desuerado y moldeo-prensado, estas operaciones, junto al salado, generan mayor cantidad de aguas residuales en la producción. Las empresas dedicadas a la elaboración de quesos presentan en sus aguas residuales los contaminantes descritos en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1: Composición de aguas residuales generadas en la producción de queso.

Parámetro	Quesos
pH	6,9
DQO (mg/l)	4500
DBO ₅ (mg/l)	2750
Sólidos en suspensión (mg/l)	850
Fósforo	35
Conductividad (μS/cm)	3150
Cloruros	220
Nitratos	105
Nitritos	35
Aceites y grasas (mg/l)	365
Detergentes	7

Fuente: EOI, 2008

Realizado por: Verónica Verdezoto, 2017

- *pH*

El pH es una medida de la acidez o basicidad de una sustancia. Significa “potencial de hidrógeno” y se calcula con el logaritmo negativo en base 10 de la concentración de iones hidrógeno presentes en la sustancia. La escala de pH va desde 0 hasta 14, donde el 7 corresponde a sustancias neutras, a la izquierda se representa la acidez y a la derecha la basicidad (Barba et al., 1991, p.24).

El pH es un parámetro de vital importancia tanto para aguas residuales como para aguas naturales, aguas residuales con valores inadecuados de pH dificultan el tratamiento biológico puesto que la actividad biológica se desarrolla en un rango de pH estricto. Si el efluente, sin una modificación previa de pH, se descarga en aguas naturales tiene la capacidad de modificar su composición y alterar la vida presente en las mismas (Espigares y Pérez, s.f., p. 15).

- *Conductividad*

La conductividad es una expresión numérica que indica la capacidad de una solución para transmitir corriente eléctrica. Esta depende de iones, su concentración, valencia, temperatura

ambiental, entre otros. Con el valor de la conductividad se puede hacer un estimativo rápido de sólidos disueltos (Romero, 2009, p. 114).

Las conductividades altas indican la presencia de impurezas y sales disueltas, principalmente sales de cloruro, nitrato, sulfato, fosfato, sodio, magnesio y calcio. La unidad básica para medir la conductividad es el Siemens por centímetro (S/cm), cada sustancia tiene una conductividad en un rango específico por lo que su medición ayuda a detectar descargas provenientes de distintas industrias y es útil como indicador de calidad de aguas dulces (Goyenola, 2007, p. 1).

- *Sólidos*

Según el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Agua [CIDTA] (s. f.) el término sólidos se refiere a toda materia sólida presente en una sustancia. Este término engloba a materia en suspensión, sedimentable, coloidal y disuelta. Los métodos para determinar sólidos son gravimétricos.

Se pueden diferenciar varios tipos de sólidos, los cuales se describen en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1: Sólidos presentes en aguas.

Sólidos	Definición
Totales	Materia que permanece como residuo después de evaporación y secado a 103°C. Incluye material disuelto y no disuelto (Sólidos suspendidos).
Disueltos	Corresponde al residuo filtrable. Se determina por la diferencia entre sólidos totales y sólidos suspendidos.
Suspendidos	Corresponde al material no filtrable o no disuelto.
Volátiles y fijos	Materia determinada a partir del análisis de sólidos suspendidos donde se somete a la muestra a calcinación a 550 °C. Se considera sólidos volátiles a la pérdida de peso y sólidos fijos al residuo remanente. Generalmente se determinan en aguas residuales y lodos como indicativos de materia orgánica.
Sedimentables	Sólidos en suspensión que sedimentan en condiciones tranquilas por acción de la gravedad.

Fuente: Romero, 2009.

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

La determinación de sólidos totales es de mayor importancia en agua potable que en agua residual debido a que en aguas residuales es complicado interpretar su verdadero significado. Los sólidos suspendidos totales y volátiles son importantes para determinar la fuerza del agua residual y para medir la eficiencia de las estaciones de tratamiento. Los sólidos sedimentables ayudan al diseño y control de rendimiento de tanques de sedimentación (Romero, 2009, p. 113).

- *Demanda Química de Oxígeno (DQO)*

Mide el material orgánico en una muestra de agua mediante oxidación química. Determina la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la materia orgánica por medio de un agente químico. La DQO es mayor que la DBO debido a que por lo general es mayor la cantidad de sustancias oxidables por vía química que por vía biológica (Espigares y Pérez, s.f., p. 13).

En muchas aguas residuales se puede establecer una relación entre la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), este hecho resulta útil debido a que la DQO puede ser calculada en menor tiempo que el necesario para determinar la DBO. Una vez se establece la relación se puede usar la DQO para controlar el funcionamiento de plantas de tratamiento (CIDTA, s.f., p. 39).

- *Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)*

Según Romero (2009, p. 175), la demanda bioquímica de oxígeno es la medida de la cantidad de oxígeno que necesitan los microorganismos para degradar la materia orgánica presente en una muestra. Su determinación está relacionada con el oxígeno disuelto que es consumido por los microorganismos en el proceso de oxidación de la porción orgánica.

El ensayo se realiza por un lapso de 5 días a 20°C, este tiempo representa del 60 al 70% de estabilización de la materia orgánica. Generalmente se expresa como DBO₅ (Espigares y Pérez, s.f., p. 13).

Este parámetro es importante para el tratamiento biológico debido a que indica la cantidad de materia orgánica biodegradable. Además, ayuda al dimensionamiento de equipos para el tratamiento de aguas residuales, para medir la eficacia de procesos de tratamiento y para el control de vertidos (CIDTA, s.f., p. 29).

- *Aceites y grasas*

Según Romero (2009, p. 94) los aceites y grasas son lípidos, compuestos poco solubles en agua pero solubles en compuestos orgánicos. Los compuestos livianos son aceitosos y los pesados grasosos. Pertenecen a uno de los principales grupos que componen la materia orgánica en aguas residuales. De acuerdo al método usado, se definen en aguas, como aquellas sustancias solubles en solventes orgánicos como freón o hexano. Los aceites y grasas en aguas residuales producen olores, por su baja solubilidad son difíciles de biodegradar y generan problemas en plantas de tratamiento y alcantarillado.

Estos compuestos, se separan de la porción acuosa y forman natas en la superficie del agua reduciendo su capacidad de flujo por conductos siendo necesaria su remoción en plantas de tratamiento. Son compuestos difíciles de tratar por la vía biológica porque interfieren en la transferencia de oxígeno del agua a las células interfiriendo en el tratamiento biológico aerobio. Su cuantificación es necesaria para determinar la necesidad del pretratamiento, la eficiencia de los procesos de remoción y el grado de contaminación de estos compuestos (Romero, 2009, pp. 197-198).

- *Otros contaminantes*

Fósforo: Es esencial para el crecimiento de los organismos. En aguas residuales se pueden encontrar como ortofosfato, polifosfato y fosfato orgánico. La forma inorgánica más importante es el fósforo soluble u ortofosfato que es directamente asimilable por los microorganismos. Altas concentraciones de fósforo en el agua producen eutrofización, crecimiento exagerado de algas por exceso de nutrientes (Espigares y Pérez, s.f., p. 16).

Nitrógeno: Es esencial para el crecimiento de microorganismos y plantas, pero en grandes concentraciones causa eutrofización. El contenido total de nitrógeno está determinado por

nitrógeno orgánico, amoníaco, nitritos y nitratos. En aguas residuales la primera forma de nitrógeno es la urea y proteínas que son fácilmente degradadas a amoníaco del cual se derivan los nitratos y nitritos (CIDTA, s.f., p. 43).

Los nitritos suelen considerarse como indicadores de contaminación fecal y son fácilmente oxidables a nitratos. Según Romero (2009, p. 142), los nitritos rara vez aparecen en una concentración mayor a 1 mg/l, incluso en aguas residuales. Los nitratos son la forma más oxidada del nitrógeno (Espigares y Pérez, s.f., p. 16).

Cloruros: Indican de manera indirecta contaminación de origen fecal pero pueden haber otros motivos que justifiquen su presencia en aguas residuales como: infiltración, uso de sustancias ablandadoras y en caso de aguas residuales de industria láctea, por el uso de salmuera para el proceso de salado del queso (Espigares y Pérez, s.f., p. 15).

Detergentes: Los detergentes se componen por tensoactivos, moléculas de gran tamaño ligeramente solubles en agua, causan espumas en las plantas de tratamiento y en el agua receptora de vertidos de agua residual, se concentran en la interfase aire agua (CIDTA, s.f., p. 25).

1.2.3.2 Tratamiento de aguas residuales

Según la Escuela Organización Industrial [EOI] (2008) el tratamiento de aguas residuales para efluentes lácteos debe contemplar la reducción de DBO₅, aceites y grasas, sólidos suspendidos y corrección del pH. De acuerdo a la concentración de los parámetros se adecuan los sistemas de tratamiento. Los tratamientos aplicables pueden ser físicos, químicos o biológicos, siendo necesario antes una etapa de pretratamiento para disminuir parámetros que interfieren en etapas posteriores.

La etapa de pretratamiento es importante antes de aplicar un tratamiento biológico porque se deben separar sólidos en suspensión y aceites y grasas. En aguas residuales de la producción de quesos es necesario además controlar los niveles de fósforo y lactosuero. Para separar aceites y grasas se usa el método de separación por flotación con adición de coagulantes y ajuste de pH para asegurar un buen rendimiento de separación. (EOI, 2008).

Las tecnologías que pueden usarse en tratamiento de aguas residuales de industrias lácteas son tratamientos de tipo bioquímico y biológico, incluyendo tratamientos con microorganismos benéficos y tratamientos biológicos anaerobios. Las plantas tradicionales generalmente cuentan con procesos de lodos activados que incluyen metabolismo microbiano de tipo aerobio de grasas, proteínas y lactosa; y de tipo anaerobio que a veces es inhibido por la presencia de grasas que causan eliminación de nutrientes (Tirado et al, 2016).

Por el alto contenido graso se realiza una eliminación previa del mismo mediante una trampa de grasas. De acuerdo al portal ambiental de la Universidad del César - Colombia [UNICESAR] (2009), las trampas de grasas son sistemas diseñados para separar los aceites y grasas de las aguas residuales evitando que estos contaminantes ingresen a la red de alcantarillado público o su interferencia en procesos posteriores. Estos equipos deben ser colocados entre la fuente de descarga y el alcantarillado.

Las trampas de grasas retardan el paso de agua haciendo posible una separación del material graso del agua residual. Los aceites y grasas flotan en la superficie mientras que los sólidos más pesados sedimentan en el fondo de la trampa permitiendo que el agua pase libremente al sistema de alcantarillado o a otros procesos de tratamiento. Las grasas recogidas por medio de este sistema son desechadas como residuo sólido a los sistemas de recolección de basura (UNICESAR, 2009).

Las aguas residuales de industrias lácteas son difíciles de tratar debido a la presencia de contaminantes orgánicos como carbohidratos, lípidos y proteínas; dando como consecuencia que los tratamientos convencionales sean costosos y consuman demasiado tiempo en el tratamiento (Behzad, 2013; citado en Tirado et al, 2016).

Según Tirado et al (2016, p. 7) el tratamiento fisicoquímico más usado en tratamiento de aguas residuales es la coagulación-floculación donde se forman aglomerados con los contaminantes que luego son removidos por filtración y sedimentación, sin embargo, estos tratamientos no son capaces de degradarlos ni eliminarlos completamente.

El uso de tratamientos de tipo biológico representa una alternativa para mejorar la eficiencia de las plantas de tratamiento. Los microorganismos eficientes, grupos de hongos, bacterias y levaduras, tienen la capacidad de usar los contaminantes presentes en el agua residual como

fuentes de carbono y energía para su metabolismo y crecimiento (Herrera y Corpas, 2013; citados en Tirado et al, 2016).

1.2.4 Aceites y grasas

Los aceites y grasas son sustancias de origen lipídico definidas como: “moléculas formadas casi de forma exclusiva por triacilglicéridos en una cantidad mayor al 95%, cuyo contenido es una molécula de glicerol que tiene tres ácidos grasos esterificados que pueden ser de muy diversa longitud” (UTN, 2016).

El término grasas hace referencia a compuestos sólidos a temperatura ambiente mientras que aceites se refieren a sustancias líquidas. Según Beyer y Walter (1987, p. 262) las grasas de origen animal están compuestas en su mayoría por glicéridos de tres ácidos grasos: oleico, esteárico y palmítico. La grasa de la leche (mantequilla) además contiene otros ácidos inferiores. De acuerdo a Romero (2009, p. 94) además de los ácidos grasos antes mencionados, en los aceites y grasas se pueden encontrar también al ácido linoleico, mirístico y araquidónico.

1.2.4.1 Triacilglicéridos

El término grasas se refiere generalmente a los triacilglicéridos. Los triacilglicéridos son una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga unidos a un glicerol. Los aceites y grasas, independientemente de su origen son mezclas de moléculas de diferentes glicéridos. Químicamente no existe diferencia entre aceites y grasas (MacFaddin, 2000, p. 269).

Los triacilglicéridos sólidos a temperatura ambiente se denominan grasas y están compuestos, en su mayoría, por ácidos grasos saturados mientras que aquellos triacilglicéridos que se presentan en forma líquida a temperatura ambiente se denominan aceites y poseen en su estructura ácidos grasos insaturados. La presencia mayoritaria de ácidos grasos saturados en las grasas hace posible su empaquetamiento compacto a diferencia de lo que sucede en los aceites (UHU, 2005, p. 35).

En células vivas, estos compuestos actúan como depósitos de energía a los cuales la célula puede recurrir en períodos de escasez de nutrientes. Los triacilglicéridos se almacenan en forma de gotas microscópicas separadas del citosol acuoso circundante (Porto, s.f., p. 6).

1.2.4.2 Aceites y grasas en el ambiente

Según el CIDTA (s. f.) los aceites y grasas presentes en aguas residuales son compuestos orgánicos de alta estabilidad por lo que su descomposición no resulta sencilla, sin embargo, pueden sufrir acción de ácidos minerales que los descomponen en ácidos grasos y glicerina. Estas sustancias disminuyen la concentración de oxígeno en los cuerpos receptores modificando sus propiedades y afectando a los organismos que viven en ella (Topanta, 2009).

Romero (2009, p. 72) menciona: “algunos ácidos carboxílicos como el ácido butírico y el valérico tienen olores extremadamente desagradables, asociados con grasas y aceites en descomposición. La descomposición anaerobia de ácidos grasos de cadena larga da como resultado la producción de ácido acético y propiónico, que se convierten en metano y dióxido de carbono”.

Las grasas insaturadas sufren reacciones de oxidación al entrar en contacto con el aire creando compuestos de sabor u olor rancio y desagradable. A nivel industrial se recurre a la hidrogenación para controlar esta reacción. La hidrogenación es un proceso químico que añade hidrógeno a las grasas insaturadas disminuyendo el número de enlaces dobles y retardando el proceso de enranciamiento (Zamora, 2016).

La oxidación de lípidos ocurre mediante reacciones en cadena de radicales libres en las cuales se diferencian etapas de iniciación, propagación y terminación. Las reacciones inician con un mínimo contacto de los ácidos insaturados con el oxígeno, por medio de reacciones laterales se producen aldehídos, cetonas y ácidos compuestos que producen la rancidez (Calvo, s.f.).

De acuerdo a Rojano (1997, p. 11), la reacción de oxidación da comienzo con la formación de un radical lipídico ($R\bullet$) a partir del lípido (RH) por acción de la luz, calor o metales pesados. El radical lipídico ($R\bullet$) reacciona inmediatamente con el oxígeno generando un radical peróxilo ($ROO\bullet$), este radical ataca a otro lípido sustrayéndole un hidrógeno para formar un hidroperóxido

lipídico (ROOH) más un nuevo radical lipídico (R•) que inicia nuevamente la propagación. La propagación se interrumpe por las reacciones de terminación, en las cuales, hay un consumo de los radicales. El proceso se resume en la Figura 1-1.

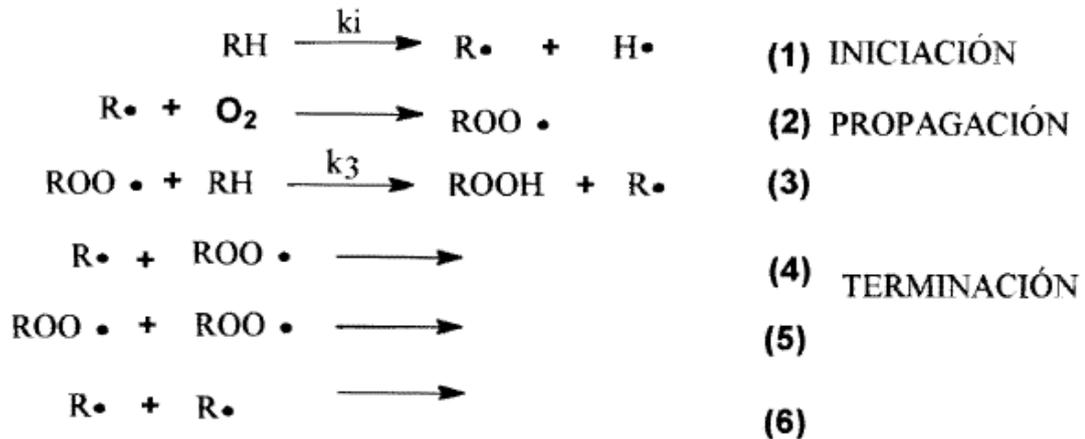


Figura 1-1: Mecanismo general de oxidación de lípidos

Fuente: (Rojano, 1997, p. 11). Oxidación de lípidos y antioxidantes

Los ácidos grasos pueden ser degradados por la respiración anaerobia de los microorganismos. La degradación anaerobia de los lípidos comienza cuando estos son hidrolizados por enzimas extracelulares producidas por microorganismos acidogénicos dando como resultado ácidos grasos de cadena larga y glicerol. Los ácidos grasos de cadena larga (compuestos solubles más sencillos) son metabolizados por bacterias acidogénicas transformándose a cadenas cortas de ácidos grasos, alcoholes, dióxido de carbono y otros productos intermedios. Los ácidos grasos de cadena corta, por acción de microorganismos acetogénicos, son transformados a ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono. Por último los microorganismos metanogénicos producen metano a partir del ácido acético más H₂ y CO₂ (FAO, 2011, p. 18). Las reacciones se resumen en la Figura 2-1.

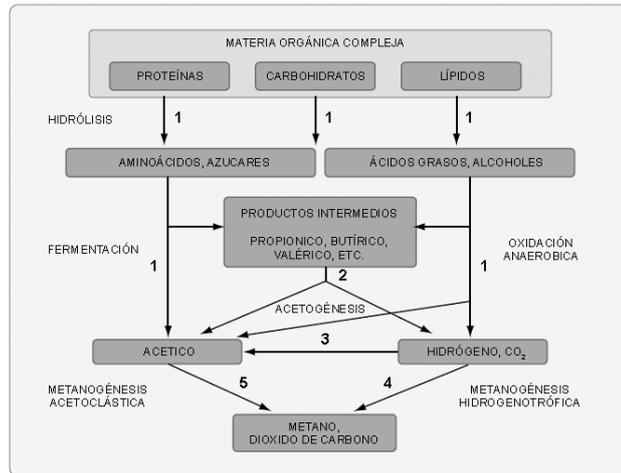


Figura 2-1: Reacciones de la digestión anaeróbica.

Fuente: (FAO, 2011, p. 19). Manual de biogás

1.2.4.3 Métodos de análisis de aceites y grasas

El análisis de aceites y grasas permite determinar las sustancias no solubles en agua que pueden disolverse en un solvente orgánico. De acuerdo al método usado, el análisis de aceites y grasas incluye todas las sustancias solubles en hexano que no se pierdan durante la evaporación posterior del solvente y el secado del residuo en un frasco de destilación. El solvente extrae las grasas y aceites, el producto de la extracción se recoge en un recipiente de destilación previamente pesado. Posteriormente se evapora el solvente orgánico y el residuo seco se pesa para conocer el contenido de aceites y grasas o sustancias extraíbles por hexano (Romero, 2009, p. 198).

Según Alvarado et al (2006) existen tres métodos para el análisis de aceites y grasas en aguas residuales:

- Método de partición gravimétrica.
- Método de partición infrarrojo.
- Método de extracción soxhet.

De acuerdo a Lermann et al (2007), el método de partición gravimétrica consiste en diluir los aceites y grasas de la muestra en un solvente de extracción. Para la aplicación de este método se transfiere la muestra a un embudo de decantación, se agita vigorosamente y se deja decantar las

fases. Se drena la fase acuosa en otro recipiente para realizar otras extracciones, cuyo número depende de la naturaleza de la muestra. La fase no acuosa se recupera en un recipiente de masa conocida. Se evapora el solvente y se pesa el recipiente.

Si no se obtiene una fase no acuosa libre de emulsiones, se somete la muestra a centrifugación o se añade sulfato de sodio anhidro que tiene la capacidad de romper las emulsiones. La concentración de aceites y grasas se obtiene por diferencia de los pesos (Lermann et al., 2007).

El método de partición infrarroja permite determinar todas las sustancias volátiles y no volátiles semejantes entre sí que sean solubles en solventes orgánicos y susceptibles de medición por espectroscopia infrarroja en el rango de 3,4 a 3,5 μ (Tensiones C-H). Para analizar aceites y grasas por medio de este método, se lava a la muestra de agua con 25 ml de tetracloruro de carbono + 0,5 g de cloruro de sodio y se dejan separar las fases. Para realizar las mediciones se ajusta el equipo para operar en un rango de 0 a 50ppm y se realizan las mediciones con el extracto no acuoso recuperado del proceso de lavado, tomando como blanco una celda con tetracloruro de carbono (APHA, 1998).

El método de extracción Soxhlet es aplicable para determinar lípidos biológicos, hidrocarburos polares de petróleo y cuando las grasas no volátiles pueden alterar el límite de solubilidad del solvente. Para aplicar este método, se somete a la muestra a una filtración al vacío usando un lecho filtrante con tierra de diatomeas, finalizada la filtración se dobla el lecho filtrante y se transfiere a un dedal de extracción. El dedal de extracción se seca por 30 minutos a 103°C y se lleva al equipo Soxhlet. La extracción se realiza por cuatro horas y la cantidad de aceites y grasas se determina por diferencia de pesos del vaso extractor (IDEAM, 2007).

1.2.5 Microorganismos lipolíticos

Se conoce como microorganismos lipolíticos a aquellos capaces de hidrolizar aceites y grasas por la acción de lipasas, enzimas que en alimentos, producen alteraciones en el sabor y el olor debido a la liberación de ácidos grasos.

Los microorganismos capaces de producir lipasas son encontrados en diversos medios, por ejemplo: en desechos, residuos vegetales, productos lácteos, suelos contaminados con hidrocarburos, etc. Producen lipasas extracelulares haciendo más fácil su extracción del medio de cultivo (Aceves y Castañeda, 2012, p. 2).

Muchos microorganismos como hongos filamentosos, bacterias y levaduras son conocidas como buenos productores de lipasas. Dentro de los más investigados destacan: *Fusarium solani*, *Penicillium restrictum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhizomucor pusillus* y *Rhizopus rhizopodiformis* (Mendoza, 2010).

1.2.5.1 Lipasas

Las enzimas son catalizadores de las reacciones de los sistemas biológicos, se caracterizan por su especificidad y porque aceleran la velocidad de reacción (UNAM, 2012, p. 60). Según lo mencionado por González et al. (2010) y Rivera y García (2007), las lipasas (glicerol-éster-hidrolasas; EC 3.1.1.3) son enzimas que hidrolizan los enlaces éster presentes en los acilglicerolos de sustratos insolubles. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza: en plantas, animales y microorganismos.

Las lipasas son enzimas solubles en agua que actúan sobre sustratos insolubles por lo que operan unidas a la interface lípido – agua. Para algunas lipasas, su pH óptimo se encuentra en niveles ácidos. A nivel biológico, las lipasas inician el metabolismo de los aceites y grasas reduciéndolos a ácidos grasos y glicerol. Las lipasas son importantes para movilizar lípidos entre células y para transferir lípidos de un organismo a otro (Rivera y García, 2007; González et al, 2010).

Las lipasas microbianas reciben especial atención por su posibilidad de aplicación biotecnológica debido a que constituyen uno de los grupos más importantes de biocatálisis. Las lipasas microbianas son más versátiles que las presentes en plantas y animales. Presentan alta estabilidad en solventes orgánicos, actividad en diversas condiciones y especificidad de sustrato (Rivera y García, 2007, p. 37).

Por lo general, las lipasas microbianas son excretadas por las células y son encontradas como enzimas extracelulares debido a que la hidrólisis de los triacilglicéridos se da fuera de la célula porque no pueden ser absorbidos de manera directa (UNAM, 2012, p. 60). Las lipasas son sintetizadas por los microorganismos en presencia de un catalizador: los lípidos. La producción de lipasas microbianas depende de la especie del microorganismo. Para su obtención, la fuente de carbono debe ser de naturaleza lipídica (Aceves y Castañeda, 2012, p.1).

1.2.5.2 Lípidos como nutrientes microbianos

Los microorganismos pueden ocupar los triacilglicéridos luego de su hidrólisis por acción de las lipasas, que dan como resultados glicerol y ácidos grasos libres. Los ácidos grasos pueden ser atacados tanto anaerobia como aerobicamente por diferentes microorganismos quimioorganótrofos (Madigan et al., 2003, p. 597).

A nivel biológico, los ácidos grasos se oxidan por medio de un proceso llamado β -oxidación en el cual se liberan dos carbonos de los ácidos grasos. El proceso comienza con la activación del ácido graso con coenzima A formando acil graso-CoA. Esta molécula pasa por una reacción de oxidación, dos de deshidrogenación donde se transfieren electrones a FAD y NAD^+ y una de tiólisis, dando como resultado la liberación de una molécula de acetyl-CoA y por la entrada de Coenzima A, se libera también un ácido graso con 2 carbonos menos en forma de acil graso-CoA, esta molécula inicia nuevamente el proceso (Madigan et al., 2003; Carrero y Herráez, 2011).

El proceso se describe en la Figura 3-1.

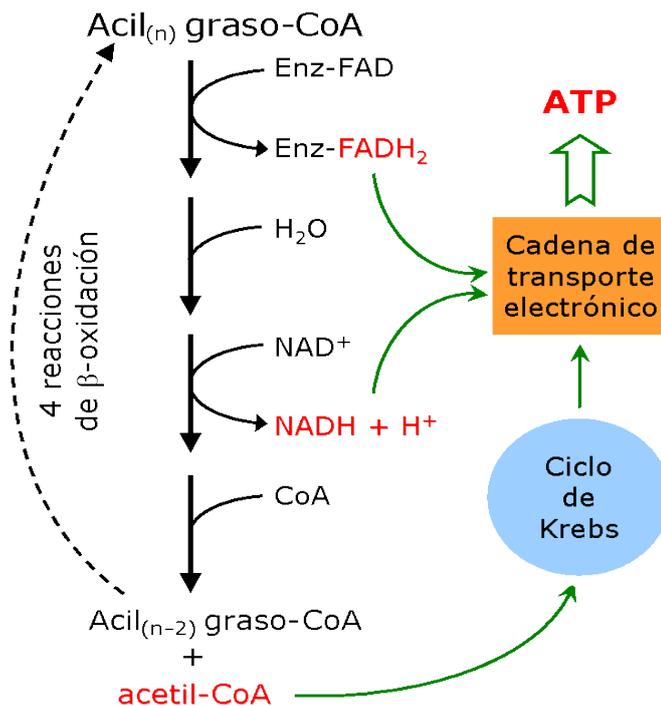


Figura 3-1: Mecanismo de β-oxidación de ácido grasos

Fuente: (Carrero y Herráez, 2011). β-oxidación mitocondrial de ácidos grasos saturados de cadena par

La mayoría de ácidos grasos tienen número par de carbonos por lo que la β-oxidación completa da como resultado únicamente la formación de moléculas de acetil-CoA. El acetil-CoA formado se oxida por medio del ciclo de ácido cítrico (ciclo de Krebs) o puede convertirse en hexosas y otros constituyentes celulares (Madigan et al., 2003, p. 597).

1.2.5.3 Hongos lipolíticos

Los hongos pueden encontrarse en diversos ambientes, algunos en ambientes acuáticos pero la mayoría se encuentran en hábitats terrestres, crecen en el suelo o sobre materia orgánica en descomposición. Son quimiorganotrofos y tienen pocos requerimientos nutricionales. Por participar en la descomposición de la materia orgánica, contribuyen en la mineralización del carbono orgánico. Un gran número de hongos son parásitos de plantas (Madigan et al., 2003, p. 482).

Ciertas variedades de hongos presentan importante actividad lipolítica tales como: *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium caseicolum* y *Geotrichum candidum*. Según menciona Sanchís et al. (1984), las enzimas producidas por hongos son importantes para infección de huéspedes, alteración de alimentos y degradación de materia orgánica.

- Género *Aspergillus*

Hongos saprófitos capaces de colonizar y degradar numerosos sustratos, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Estos hongos se caracterizan por tener hifas septadas hialinas. Sus colonias consisten en un conjunto de hifas que dan lugar a la formación de un micelio. El género es reconocido como el mayor productor de enzimas lipasas (UCDAVIS, 2014a; Rosas, 2015).

De acuerdo al Instituto de Seguridad, Salud y Bienestar en el Trabajo de España [INSHT] (2012), existen varias especies que se diferencian por su tamaño, tasas de crecimiento, textura (aterciopelada, algodonosa, etc.) y color de la colonia. La morfología y coloración del conidióforo varía de una especie a otra. La coloración se da en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en los conidios.

Las especies de *Aspergillus* crecen sobre plantas y árboles. Comúnmente son aislados del suelo, restos de plantas y del aire. Se pueden encontrar sobre frutas y alimentos azucarados y ricos en carbohidratos. Se desarrollan a pH ácidos aunque algunas especies pueden ser inhibidas a pH < 4,6. Su temperatura de crecimiento varía entre los 17-42°C encontrándose su temperatura mínima de crecimiento entre los 11 y 13°C (UCDAVIS, 2014a).

Algunas especies son: *Aspergillus flavus* de coloración verde-amarillenta, *Aspergillus niger* negro, *Aspergillus terreus* marrón. Se observan las colonias de estos hongos en la Figura 4-1.



Figura 4-1: *A. flavus*; *A. niger*; *A. terreus*

Fuente: (Tormo, 2014a; LIFE, s.f.; Cannon, 2013)

- Género *Penicillium*

Hongos filamentosos ampliamente distribuidos en la naturaleza, se hallan en el suelo, vegetación caída, agua y aire. Obtienen sus nutrientes de materia orgánica muerta y en descomposición.

Se identifican por la manera en que las conidias se forman. Sus esporas se esparcen fácilmente por el agua o por el aire. Son capaces de producir enzimas extracelulares entre ellas lipasas, por lo que se usan para producirlas a nivel industrial (Rosas, 2015; UCDAVIS, 2014b).

Las colonias de *Penicillium* son circulares y el color del micelio varía de acuerdo a la especie. Según Tangarife (2011), inicialmente las colonias presentan colores blancos que luego se convierten en amarillos, anaranjados, púrpuras, verdes-azulados, o pardos. La superficie de la colonia madura puede ser ligeramente algodonosa, aterciopelada o pulverulenta. Son encontrados en mayor cantidad en regiones templadas (UCDAVIS, 2014b).

Pueden crecer sobre alimentos preparados o sus materias primas. Generalmente son aislados de suelos, cereales, ensilaje, panes, cebollas, ajo, queso, nueces, frutas y otros alimentos. La mayoría de las especies de *Penicillium* tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 20-26°C (Carrillo, 2015a, p. 63).



Figura 5-1: *Penicillium spp.*

Fuente: (d'Aleo, 2013)

Los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* pueden encontrarse en cualquier tipo de sustratos orgánicos y pueden cultivarse en condiciones óptimas de aireación y agitación, además, son fuentes de lipasas especialmente si provienen de residuos vegetales. (Mendoza et al., 2014)

- Género *Fusarium*

Hongos saprófitos, ubicuos y cosmopolitas en la naturaleza, hongos filamentosos cuyas colonias pueden ser blancas, rosadas, moradas o rojizas de textura algodonosa. Se han aislado de varias condiciones climáticas pero son comunes en zonas tropicales y templadas. Es considerado modelo de patogénesis multihospedero por su capacidad de infectar a plantas, animales y personas (Castillo, 2013).

Se encuentran en cultivos de arroz, soya, frijol, entre otros. Es un contaminante común y fitopatógeno. El género abarca más de 20 especies, entre las que destacan *F. solani*, *f. oxysporum*, *F. moniliforme*. Las colonias crecen profusamente, el micelio es denso y algodonoso. Los pigmentos que se difunden en el agar varían de tómo de acuerdo al pH. El hongo puede ser aislado de vegetales y cereales, son aerobios estrictos y sensibles al calor. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 22-28°C (Tangarife, 2016; Carrillo, 2015b).



Figura 6-1: *Fusarium spp*

Fuente: (d'Aleo, 2014)

CAPÍTULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Hipótesis y especificación de las variables

2.1.1 *Hipótesis*

El tratamiento biológico con hongos permite la degradación de aceites y grasas en las aguas residuales de Queseras Artesanales de Quimiag.

2.1.2 *Variables*

2.1.2.1 *Variable dependiente*

Concentración de aceites y grasas.

2.1.2.2 *Variables Independientes*

Hongos (*Aspergillus* spp, *Penicillium* spp y *Fusarium* spp)

2.2 Tipo y Diseño de Investigación

La investigación es de tipo correlacional-experimental debido a que se llevó a cabo una comparación entre los tratamientos usados para determinar con cual se generó un mejor resultado por medio de distintas unidades experimentales.

Diseño experimental:

El diseño experimental de la presente investigación fue unifactorial con n tratamientos.

Tabla 1-2: Diseño experimental

UNIDADES EXPERIMENTALES	HONGOS	TRATAMIENTOS	REPETICIONES
UE 1	Tratamiento de control	TC	3
UE 2	<i>Aspergillus</i> spp. (A)	TA	
UE 3	<i>Penicillium</i> spp. (P)	TP	
UE 4	<i>Fusarium</i> spp. (F)	TF	
UE 5	Inóculo mixto (M)	TM	

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

2.3 Unidad de análisis

Cada unidad experimental constó de un frasco con 1500 ml de agua residual, dando un total de 15 unidades experimentales.

2.4 Población de estudio

Agua residual de la Quesera Artesanal representativa de Quimiag.

2.5 Tamaño de muestra

Cinco unidades experimentales con tres repeticiones de 1,5 l cada una, dando un volumen total de 22,5 l de agua residual.

2.6 Selección de la muestra

El agua residual usada en la investigación se tomó de acuerdo a los ciclos de producción de la Quesera Artesanal representativa de Quimiag.

2.7 Técnicas de recolección de datos

2.7.1 Localización y descripción del lugar

La parroquia rural Quimiag pertenece al Cantón Riobamba, provincia de Chimborazo, está ubicada al sur oriente a 9,0 Km de distancia de la ciudad, las principales actividades económicas realizadas en la parroquia son el turismo, agricultura y ganadería.

En la parroquia existen 12 pequeñas industrias dedicadas a la elaboración artesanal de quesos y otros productos lácteos. La presente investigación se realizó con el agua residual generada por la industria láctea “El Pajonal”, considerada la industria representativa de la zona por su producción, infraestructura, porcentaje de cumplimiento, accesibilidad y apertura para la realización de la investigación.

La industria láctea “El Pajonal” recibe alrededor de 1800 l de leche diarios provenientes de distintos lugares de la parroquia. De acuerdo a la evaluación sobre Buenas Prácticas de Manufactura realizado por el Ministerio de Industrias y Productividad Zona 3 (2016), esta industria presenta un cumplimiento del 42% en instalaciones, 67% en equipos y 20% en operaciones, siendo la industria con los valores más altos de cumplimiento a nivel de la parroquia.

La industria produce diariamente 360 quesos redondos de 500g y 200 quesos de 700g en 8 ciclos productivos que abarcan desde el tratamiento térmico hasta el salado del queso. Se estiman pérdidas diarias de 30 l de leche que entran al sistema de drenaje. El agua se usa principalmente para el enfriamiento de la leche después del tratamiento térmico. Se cuenta con un sistema de recirculación por el cual una parte del agua usada para el enfriamiento es almacenada para otras operaciones mientras que el resto se deja ir al sistema de alcantarillado.

Por observación directa, se comprobó que a nivel de la producción, la mayor cantidad de agua residual se genera en las operaciones de moldeo y prensado del queso, además, el agua residual generada en estas etapas se mezcla con suero de leche y otros residuos antes de entrar directamente al sistema de alcantarillado. Se estima una producción de 90 l de suero de leche por cada ciclo de producción. La mayor parte del volumen de suero de leche generado se recupera por medio de un

sistema de drenaje aunque una parte se pierde por el mismo proceso y por rebose de los recipientes que lo reciben.

La industria cuenta con un sistema de alcantarillado independiente para la planta de producción por lo que el agua residual no se mezcla con otras aguas sino hasta su llegada a las cajas de revisión. La industria no cuenta con una cantidad estimada del volumen de agua total que entra en el proceso de producción.

Proceso productivo

La quesera artesanal recibe leche desde las siete de la mañana hasta el mediodía. La leche es primero sometida a un análisis físico-químico para confirmar su calidad e inocuidad. La producción inicia con el tratamiento térmico de la leche, después de su enfriamiento pasa al proceso de coagulación por la adición de cuajo.

Concluido el tiempo de coagulación se realiza el corte y desuerado para separar el suero de leche y se da paso a la etapa de moldeo y prensado. Tomando en cuenta el tipo de queso a elaborarse se pasa al salado y finalmente el producto se empaca y etiqueta. El producto terminado es almacenado en cuarto fríos hasta su distribución.

2.7.2 *Recolección de la muestra*

Tomando en cuenta el proceso productivo y los ciclos de producción, se tomó una muestra compuesta del agua residual generada en la etapa de moldeo y prensado. El agua residual se recolectó directamente en la canaleta de salida antes de su ingreso a la red de alcantarillado.

Se realizaron en total cuatro muestreos en distintas semanas. El muestreo se realizó durante las horas de mayor producción tomando aproximadamente 30 l de agua de cada ciclo, el agua residual se recolectó en un recipiente de 180 l capacidad. Una vez obtenida la muestra compuesta, se homogenizó y se midió la temperatura y pH in situ.

La medición de la temperatura se realizó por medio de un termómetro y el pH se determinó usando tiras indicadoras. Para el análisis físico-químico se tomó 1 l de agua en una botella ámbar y para el análisis microbiológico se tomó agua residual en un recipiente estéril.

2.7.3 Caracterización de parámetros físico-químicos y microbiológicos

Para la caracterización físico-química y microbiológica inicial del agua residual se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

- pH
- Temperatura
- Conductividad
- Sólidos totales
- Sólidos suspendidos
- Nitratos
- Nitritos
- Cloruros
- Fosfatos
- DBO₅
- DQO
- Aceites y grasas
- Coliformes totales
- Coliformes fecales

Tanto el pH como la temperatura fueron medidos in situ, los demás parámetros fueron analizados por el Laboratorio de Servicios Ambientales de la Universidad Nacional de Chimborazo [UNACH].

Tabla 2-2: Análisis físico-químicos y microbiológicos

PARÁMETRO	MÉTODO/PROCEDIMIENTO
Aceites y grasas	EPA 418.1
DQO	STANDARD METHODS 5220-D mod
DBO5	STANDARD METHODS 5210-B
Sólidos suspendidos	STANDARD METHODS 2540-D
Sólidos totales	STANDARD METHODS 2540-B
Fosfatos	STANDARD METHODS 4500-P-E
Cloruros	STANDARD METHODS 35000-CI E
Coliformes totales	STANDARD METHODS 9221-B
Coliformes fecales	STANDARD METHODS 9221-B
Nitritos	STANDARD METHODS 4500-NO2-
Nitratos	STANDARD METHODS 4500-NO3-E

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

Fuente: UNACH. 2017

Se realizó también un conteo de mohos y levaduras usando diluciones seriadas del agua residual. La siembra se realizó usando la técnica de siembra en superficie, la cual consiste en tomar 100 µl de la muestra, colocarla en la caja Petri con medio de cultivo y distribuirla hasta su absorción usando una espátula de vidrio estéril (Madigan et al., 2003, p. 146).

Se utilizó el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) y se preparó siguiendo las especificaciones del fabricante: 39g por cada litro de medio, tomando en cuenta el volumen de agar que se colocó en cada placa. Las placas se incubaron a 25°C por 5 días. Para asegurar el crecimiento único de hongos se agregó el antibiótico cloranfenicol a una concentración de 100 µg/ml de medio (ISPCH, 2008).

2.7.4 Identificación macroscópica y microscópica

Las cepas usadas en la investigación se obtuvieron del banco de microorganismos de los Laboratorios Dr. Falconi-Borja PhD. Según información proporcionada por el laboratorio, dichas cepas fueron aisladas de residuos vegetales, cultivadas en agar PDA e incubadas a 28°C.

La confirmación de los géneros se realizó por medio de sus características morfológicas tanto en el medio de cultivo (macroscópicas) como en observación de su micelio al microscopio. Cada hongo fue sembrado en una caja Petri con agar PDA y fueron incubados a 25°C por cinco días. Como características morfológicas macroscópicas se tomaron en cuenta la coloración del micelio, la coloración visible en el reverso de la placa, su textura, bordes y tipo de micelio.

Para la observación microscópica se realizó tinción de azul de lactofenol siguiendo la metodología descrita por López et al. (2014) donde se coloca una gota de azul de lactofenol sobre el portaobjetos, con una porción de cinta aislante se toma una muestra de micelio del borde externo de la colonia desarrollada por cinco días y se la coloca sobre la gota del tinte, se coloca el cubreobjetos y se observa al microscopio usando el aumento 40X.

Para confirmar el género y especie del hongo se realizó una comparación con la bibliografía disponible sobre características morfológicas de hongos filamentosos.

2.7.5 Determinación de actividad lipolítica

Para confirmar la actividad lipolítica de los hongos, se los sembró sobre Agar base Tributirina con mantequilla y se los incubó a 25°C por un período de 10 días. La actividad lipolítica se midió por observación de aclaramiento del medio.

Para determinar la actividad lipolítica de las levaduras presentes en el agua residual, se inoculó 1ml del agua en tubos con caldo mínimo y se dejaron incubar por 7 días a una temperatura de 25°C. Concluido el tiempo de incubación, se realizó una siembra por superficie en agar aceite de oliva y agar base Tributirina con mantequilla.

Las cajas se incubaron a 25°C por un periodo de cinco días. La actividad lipolítica de los organismos se determinó por la aparición de zonas de aclaramiento alrededor de aquellas colonias capaces de degradar lípidos.

2.7.5.1 Preparación de medios de cultivo

- Agar base Tributirina con mantequilla

El medio de cultivo fue preparado según la metodología descrita por Castillo (2013) y se explica en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2: Composición del Agar base Tributirina con mantequilla

COMPOSICIÓN		PREPARACIÓN
Extracto de levadura	3g/l	Se disuelve la mantequilla en agua caliente y se agregan los demás componentes, se homogeniza y se esteriliza en autoclave a 121°C por 15min.
Peptona	5g/l	
Mantequilla	25g/l	
Agar-agar	15g/l	

Fuente: Castillo, 2013

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

- Caldo mínimo M9

El caldo mínimo se preparó según la metodología descrita por Geerlof (2010) y se explica en la Tabla 4-2.

Tabla 4-2: Composición del Caldo Mínimo

COMPOSICIÓN		PREPARACIÓN
Sales M9		Disolver los componentes en 800 ml de agua destilada y ajustar 1000ml. Autoclavar por 15 min a 121°C.
Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O	75,2g	
KH ₂ PO ₄	30,0g	
NaCl	5,0g	
NH ₄ CL	5,0g	
Caldo mínimo		Disolver los componentes en 700 ml de agua destilada y ajustar a 1000ml. Ajustar el pH a 7,2 y autoclavar 15 minutos a 121°C.
Sales M9	100ml	
MgSO ₄ 1M (estéril)	1ml	
CaCl ₂ 1M (estéril)	100μl	
Glucosa 20% (estéril)	20ml	

Fuente: Geerlof, 2010

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

- Agar Aceite de Oliva

El agar aceite de oliva se preparó según la metodología descrita por el Instituto Nacional de Salud de Perú [INS] (2010, p. 479) y se explica en la Tabla 5-2.

Tabla 5-2: Composición del Agar Aceite de Oliva

COMPOSICIÓN		PREPARACIÓN
Agar Sabouraud dextrosa	6,5 g	Disolver los ingredientes en el agua destilada, homogenizar y llevar a esterilización en autoclave a 121° C por 15 minutos.
Tween 80	2 ml	
Aceite de oliva	2 ml	
Vitamina A	10 gotas	
Agua destilada	100 ml	
Cloranfenicol	0,001 g	

Fuente: INS, 2010, p. 479

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

2.7.6 Pruebas de antagonismo

Las pruebas de antagonismo se realizaron para formular el inóculo mixto que se usó en una de las unidades experimentales. Las pruebas se realizaron siguiendo la técnica de cultivo Dual en cajas Petri con Agar PDA.

Según Fernández y Suárez (2009), la técnica de cultivo dual consiste en colocar en el extremo de una caja Petri con agar PDA 4mm de micelio del antagonista y en el extremo opuesto 4mm de micelio del hongo patógeno a una distancia de 5cm a 7cm. Como control se tomó a cada microorganismo sembrado en una caja Petri con agar.

Cada prueba de antagonismo se realizó por triplicado. El procedimiento realizado se describe en la Figura 1-2.

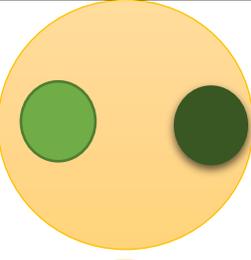
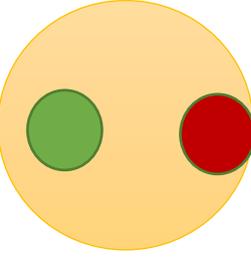
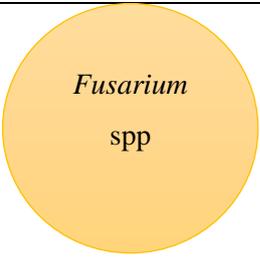
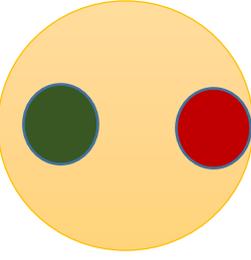
CONTROLES	PRUEBAS DE ANTAGONISMO
 <p style="text-align: center;"><i>Aspergillus</i> spp</p>	 <p style="text-align: center;"><i>Aspergillus</i> spp <i>Penicillium</i> spp</p>
 <p style="text-align: center;"><i>Penicillium</i> spp</p>	 <p style="text-align: center;"><i>Aspergillus</i> spp <i>Fusarium</i> spp</p>
 <p style="text-align: center;"><i>Fusarium</i> spp</p>	 <p style="text-align: center;"><i>Penicillium</i> spp <i>Fusarium</i> spp</p>

Figura 1-2: Metodología de pruebas de antagonismo

Fuente: (Fernández y Suárez, 2009).

Las cajas fueron incubadas a 25°C por 10 días, midiéndose el radio de la colonia cada 24 horas para controlar cuando se dio el primer toque entre los micelios de los hongos. El nivel de antagonismo se midió de acuerdo a la escala de clases propuesta por Bell et al. (1982, p. 379) la cual consiste en 5 clases de antagonismo: la clase 1 cuando el hongo *a* cubre totalmente al hongo *b*, la clase 2 cuando el hongo *a* sobrepasa las 2/3 partes de la superficie del medio de cultivo, la clase 3 cuando los hongos *a* y *b* colonizan aproximadamente la mitad del medio cada uno y ningún organismo parece dominar al otro, la clase 4 cuando el hongo *b* coloniza por lo menos 2/3 del medio de cultivo y la clase 5 cuando el hongo *b* cubre totalmente la caja sobrepasando al hongo *a*.

2.7.7 Preparación del inóculo de *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp y *Fusarium* spp

Para obtener el inóculo se prepararon soluciones de esporas. El proceso de obtención de solución de esporas consiste en retirar las esporas del micelio del hongo a través de medios mecánicos usando un líquido para liberarlas y recolectarlas a través de una filtración (Cazar, 2006 citado en Durán y Mosquera, 2007).

2.7.7.1 Inóculo de *Aspergillus spp* y *Penicillium spp*

Para la preparación del inóculo se sembraron los hongos *Aspergillus spp* y *Penicillium spp* desarrollados por cinco días en Erlenmeyer con Caldo Papa y Dextrosa. El medio de cultivo se preparó de acuerdo a la metodología propuesta por Cañedo y Ames (2004, p. 21) y se describe en la Tabla 6-2.

Tabla 6-2: Preparación del Caldo Papa y Dextrosa

COMPOSICIÓN		PREPARACIÓN
Papa sin pelar	200 g	Lavar las papas, cortarlas y hacerlas hervir por 20 minutos en un litro de agua destilada. Filtrar la solución, disolver la dextrosa, reconstituir el volumen y esterilizar en autoclave a 121°C por 20 minutos.
Dextrosa	10 g	
Agua destilada	1000 ml	

Fuente: Cañedo y Ames, 2004, p. 21

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

Se usaron Erlenmeyer de 500ml y 250 ml de volumen, en cada uno se colocó 100ml de caldo y se sembraron porciones de agar de aproximadamente 1 cm² con el hongo en desarrollo, se sellaron y se dejaron incubar por cinco días a 25°C. Pasados los 5 días se tomaron los Erlenmeyer y se obtuvieron las soluciones de esporas por agitación y filtración.

2.7.7.2 Inóculo de *Fusarium spp*

El inóculo de *Fusarium spp* se realizó mediante la siembra masiva del hongo en cajas Petri con agar PDA. Las cajas se dejaron incubar por cinco días a 25°C. Para obtener las soluciones de esporas se siguió la metodología descrita por Durán y Mosquera (2007, p. 36): una vez desarrolladas las colonias, se colocó 10ml de agua destilada estéril en cada caja y con un asa de siembra flameada se realizó un raspado total del micelio, la solución obtenida se recolectó en frascos de vidrio estériles.

2.7.8 *Conteo de esporas*

Se realizó un conteo de esporas con el objetivo de obtener una concentración inicial aproximada de 1 x 10⁶ esporas por cada ml de agua residual a tratar. Para contar las esporas se usó una cámara de recuento, específicamente la cámara de Neubauer.

La cámara de Neubauer ayuda a realizar el conteo de esporas en un campo de dimensiones conocidas lo que permite determinar el número de esporas por mililitro de la solución inicial (Peña y Páez, 2014). La cámara de Neubauer está formada por nueve cuadrados de 1mm^2 y $0,1\text{ mm}$ de profundidad, el cuadrado central a su vez está dividido en 400 cuadrados pequeños de $0,0025\text{ mm}^2$ tal como se observa en la Figura 2-2.

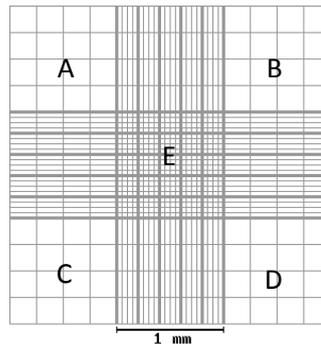


Figura 2-2: Cámara de Neubauer

Fuente: (Bicandi et al, 2004). http://insilico.ehu.eus/counting_chamber/

El conteo de esporas de *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp se lo realizó en la zona central de la cámara (E) mientras que el conteo de las esporas de *Fusarium* spp se realizó en los cuadrados extremos y el central (A, B, C, D y E). Una vez lavado y desinfectado el equipo se le colocó el cubreobjetos encima y con una pipeta automática se tomó una alícuota de la solución de esporas previamente homogenizada.

Para cargar la cámara se colocó la punta de la pipeta con la muestra en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara y se permitió que la muestra penetre por capilaridad desde el lateral, tomando en cuenta que se debe evitar que el cubreobjetos se mueva y la formación de burbujas de aire (Bastidas, s.f.).

Antes de realizar el conteo de esporas en el microscopio, se dejó reposar unos minutos la muestra en la cámara. El conteo se realizó usando el lente de aumento 40X y se tomaron en cuenta 8 cuadrados en diagonal para el conteo de esporas de *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp. Para el conteo de esporas de *Fusarium* spp se usaron los cinco cuadrados de 1mm^2 especificados anteriormente.

Cada conteo se realizó por triplicado, tanto por muestra como por cada lectura. Para determinar el número de esporas se sacó un promedio de cada conteo y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ esporas}}{\text{ml}} = \frac{TCC}{\# \text{ cuadrados}} \times Cc$$

Donde:

TCC: Promedio del total de esporas contabilizadas.

Cc: Constante de la cámara usada.

2.7.9 Inoculación del agua residual

Para la inoculación de los hongos en la muestra de agua residual, se recolectó aproximadamente 30 l de agua de la muestra compuesta y se colocó 1,5 l en 15 frascos de vidrio estériles de 1,9 l de capacidad. La inoculación de las soluciones de esporas en el agua se realizó siguiendo un modelo completamente aleatorio.

Se llevaron a cabo cuatro tratamientos más un tratamiento control con tres repeticiones cada uno, la inoculación se realizó en el agua residual sin suplemento nutricional de la siguiente manera:

- Tratamiento A (*Aspergillus* spp + Agua residual): 100ml de solución de esporas.
- Tratamiento P (*Penicillium* spp + Agua residual): 100ml de solución de esporas.
- Tratamiento F (*Fusarium* spp + Agua residual): 150 ml de solución de esporas.
- Tratamiento M (Inóculo mixto + Agua residual): 100ml de solución de esporas de *Aspergillus* spp + 100 ml de solución de esporas de *Penicillium* spp + 150 ml de solución de esporas de *Fusarium* spp.
- Tratamiento C (Control agua residual): Sin inoculación de hongos.

Una vez inoculadas las unidades experimentales, se colocó el sistema de aireación en cada una de ellas y se sellaron con parafilm de tal manera que quedara cubierta la mayor parte de la boca del frasco con excepción del sitio de entrada de la manguera de aireación. Se colocaron en dos cajas

construidas con poliestireno para controlar cambios bruscos de temperatura. Las unidades experimentales fueron incubadas a temperatura ambiente y con aireación constante por un periodo de 17 días.

2.7.10 Determinación de la eficiencia degradativa de aceites y grasas

Para la evaluación de la degradación de aceites y grasas en los tratamientos aplicados se realizaron análisis de aceites y grasas a los 3, 5, 10 y 17 días de experimentación. Además, se midió el crecimiento de los hongos en los mismos períodos especificados anteriormente y diariamente se realizaron mediciones de pH y temperatura de cada unidad experimental. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias de Duncan usando el paquete estadístico IBM SPSS versión 19.

- Análisis de aceites y grasas

Para los análisis de aceites y grasas, se tomaron por succión muestras con un volumen de 250ml de cada unidad experimental. El análisis de aceites y grasas se realizó usando el método de partición gravimétrica.

Primero se homogenizó la muestra y se la preparó para la etapa de lavado. Para el proceso de lavado se colocaron los 250ml de la muestra a analizarse en un embudo de separación de 500ml de capacidad y sobre ella se vertieron 30ml de hexano. Se tapó el embudo y con movimientos suaves se procedió a agitarlo por aproximadamente cinco minutos, abriendo la llave de salida periódicamente para permitir la expulsión de los vapores generados.

Una vez mezclada la muestra con el solvente, se dejó reposar por unos minutos para permitir la separación de los aceites y grasas de la fase acuosa. Cuando se observó la formación de dos fases claramente diferenciadas, se recolectó la fase acuosa en un recipiente de vidrio y la fase grasa disuelta en el hexano se colocó en un balón esmerilado previamente tarado.

Se repitió el proceso de lavado con el agua recolectada de la primera separación. La nueva fase grasa disuelta en el solvente se colocó en el mismo balón esmerilado con lo obtenido de la primera extracción.

Se llevó al balón a un rotavapor para separar el solvente de los aceites y grasas, luego se colocó al balón con el residuo de la extracción en una estufa por una hora. Pasado el tiempo se tomó al balón se dejó enfriar hasta que alcanzó la temperatura ambiente y se pesó nuevamente.

La concentración de aceites y grasas se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{concentración de aceites y grasas} = \frac{Pf - Pi}{Vm}$$

Donde

Pf: Peso del balón luego del proceso de extracción.

Pi: Peso inicial del balón.

Vm: Volumen de muestra usado.

- *Control del crecimiento de hongos*

Para el control del crecimiento de los hongos en las unidades experimentales, se tomaron muestras de 1ml de la cada unidad experimental sometida a los tratamientos A, P, F y M y se realizó una siembra por superficie sobre agar PDA tomando 100µl de cada muestra. Las cajas se dejaron incubar por cinco días a 25°C.

De acuerdo al número de colonias de hongos visibles en cada cultivo se determinó su grado de crecimiento usando la siguiente escala:

ALTO (+++) caja llena - colonias incontables

MEDIO (++) caja parcialmente llena - > 50 colonias

BAJO (+) caja con poco crecimiento - ≤ 20 colonias

NO VISIBLE (-) caja sin crecimiento – sin colonias visibles

- *Análisis adicionales*

Adicionalmente se realizaron análisis de DQO, DBO₅, sólidos totales, sólidos suspendidos y conductividad al final de la experimentación.

Para los análisis de DBO₅ y DQO se realizaron diluciones de la muestra al 20% y se colocaron en digestores específicos para cada parámetro. Los sólidos suspendidos se midieron por medio de un espectrofotómetro con soluciones de la muestra al 10%.

Para medir los sólidos totales se tomaron alícuotas de 10ml de cada muestra, se colocaron en cajas previamente taradas y se sometieron a baño maría hasta su total evaporación, se secaron en una estufa y se dejaron enfriar en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente. Una vez fríos se procedió a pesarlos nuevamente y la cantidad de sólidos totales se determinó por diferencia de pesos aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{sólidos totales} = \frac{Pf - Pi}{Vm}$$

Donde

Pf: Peso de la caja luego del proceso de evaporación, secado y enfriamiento.

Pi: Peso inicial de la caja.

Vm: Volumen de la muestra.

CAPÍTULO III

3 MARCO DE RESULTADOS

3.1 Resultados, análisis y discusión

3.1.1 Caracterización de parámetros físico-químicos y microbiológicos

Los resultados de los análisis de los distintos muestreos del agua residual se exponen en la Tabla 1-3:

Tabla 1-3: Caracterización física-química y microbiológica del agua residual

PARAMETRO	UNIDAD	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4
pH		4,29	5,75	6,11	6,08
Temperatura	°C	30	32	30	28
Conductividad	µs/cm	2150	2930	2080	3040
Sólidos totales	mg/l	11776	16814	79090	40674
Sólidos suspendidos	mg/l	4350	3450	15471	3900
Nitratos	mg/l	623	2035	958	1350
Nitritos	mg/l	1,65	2,55	0,79	2,4
Cloruros	mg/l	141800	560	484	502
Fosfatos	mg/l	280	227	168	485
DBO ₅	mg/l	7800	16684	17860	19598
DQO	mg/l	14900	27350	29456	34450
Aceites y grasas	mg/l	1454	1248	2968	2746
Coliformes totales	NMP/100ml	412	508	552	620
Coliformes fecales	NMP/100ml	Ausencia <2	Ausencia <2	Ausencia <2	Ausencia <2

Fuente: UNACH, 2017

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

Los resultados de los análisis concuerdan con las características descritas por la EOI (2008) por presentar altos valores de DBO₅ y DQO debido a la presencia de materia orgánica. Presentan también altos valores de conductividad y sólidos suspendidos por ser una industria dedicada a la elaboración de quesos.

Los valores de pH, temperatura, conductividad, sólidos suspendidos y nitritos se encuentran dentro de los rangos mencionados por Villena (2007) y la Escuela de Organización Industrial [EOI] (2008) para aguas residuales generadas en industrias lácteas y productoras de quesos. Sin embargo, mencionan valores límites de 8500, 160, 469, 160, 2750, 4500 y 500 mg/l para sólidos totales, nitratos, cloruros, fosfatos, DBO₅, DQO y aceites y grasas respectivamente. Los resultados obtenidos sobrepasan los rangos descritos por los autores principalmente por la presencia de lactosuero en el agua residual usada para la investigación, esto se fundamenta en lo dicho por el CAR/PL (2002) donde se menciona que el suero de leche provoca un aumento en la DQO y DBO₅ de las aguas residuales debido a su alto contenido orgánico y presencia de aceites y grasas.

Los valores usados para la elaboración de la investigación corresponden al muestreo 4, estas concentraciones se asemejan a los valores iniciales obtenidos por Bhumibhamon et al (2002) en su trabajo sobre biodegradación de aguas residuales ricas en aceites y grasas usando microorganismos productores de lipasas. Sin embargo los valores de DBO₅ y DQO son superiores.

En cuanto al análisis microbiológico, el agua residual presentó coliformes totales pero se reportó ausencia en coliformes fecales, lo que significa que el agua residual no presenta contaminación de tipo fecal ya que es un agua generada únicamente durante la producción del queso. Los coliformes totales se encuentran en el medioambiente (NCPH, 2009) por lo que su incorporación al agua residual podría ser explicada por arrastre de contaminantes presentes en el suelo y en la canaleta de salida del agua residual.

En los cultivos del agua residual en cajas Petri no se obtuvo crecimiento de hongos filamentosos pero sí se dio un crecimiento de levaduras, su cantidad fue variable en los distintos muestreos, hecho atribuible a que el agua residual se genera en el momento de la producción y las levaduras pueden incorporarse por distintos medios a ella.

Aplicando un análisis de componentes principales, usando el software estadístico IBM SPSS versión 19, se encontraron que todos los parámetros analizados se relacionan íntimamente entre sí (Determinante=0,000).

Las relaciones existentes entre los parámetros se muestran en la Tabla 2-3:

Tabla 2-3: Matriz de componentes rotados^a

	Componente		
	1	2	3
Cloruros	-,988	-,121	
DBO ₅	,986	,105	,128
pH	,971	,233	
DQO	,965		,257
ColiformesTotales	,896		,439
Nitratos	,700	-,508	-,502
SolidosSuspendidos	,160	,986	
Nitritos	,278	-,959	
Conductividad	,270	,944	-,189
SolidosTotales	,475	,850	,228
Temperatura			-,994
Fosfatos	,201	-,590	,782
AceitesyGrasas	,487	,614	,621

Realizado por: Verónica Verdezoto, 2017

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

Método de rotación: Normalización Varimax con Kaiser

a. La rotación ha convergido en 5 iteraciones.

El primer grupo muestra asociaciones entre el pH, coliformes totales, nitratos, DBO₅ y DQO que se relacionan con contaminación de tipo orgánica en el agua residual. Las relaciones altas del DQO y DBO₅ implican una alta concentración de materia de tipo orgánico. Los valores de pH pueden afectar la determinación de la DBO₅ (Barba, 2002, p. 26)

El segundo componente formado por sólidos suspendidos, sólidos totales y conductividad confirma variación en los parámetros físicos del agua residual relacionados con las partículas resultantes en la etapa de coagulación de la leche y que se pierden durante la producción del queso.

El tercer grupo muestra una baja relación entre aceites y grasas y fosfatos, no se encontró información de relación entre estos dos componentes aunque puede asociarse al método de análisis de los aceites y grasas y los distintos tipos de sustancias que se abarcan en él.

3.1.2 Identificación macroscópica y microscópica

3.1.2.1 Género *Penicillium*

- Características macroscópicas

Coloración: Colonias de color verde oscuro y en el reverso de la caja, color amarillo intenso.

Bordes: Bordes definidos de color blanco.

Textura: De apariencia pulverulenta.

Tipo de micelio: No presentan micelio aéreo.

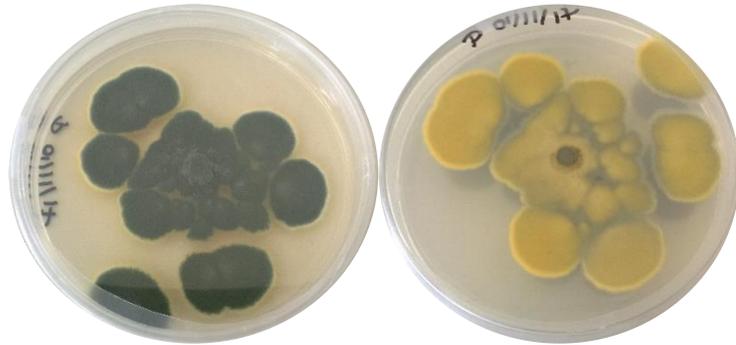


Figura 1-3: Cultivo hongo *Penicillium* spp

Fuente: Verónica Verdezoto. 2017

- Características microscópicas

Se observaron conidios con estructura ramificada semejante a un pincel. Según Carrillo (2015a) este tipo de estructuras caracterizan al el género *Penicillium*.

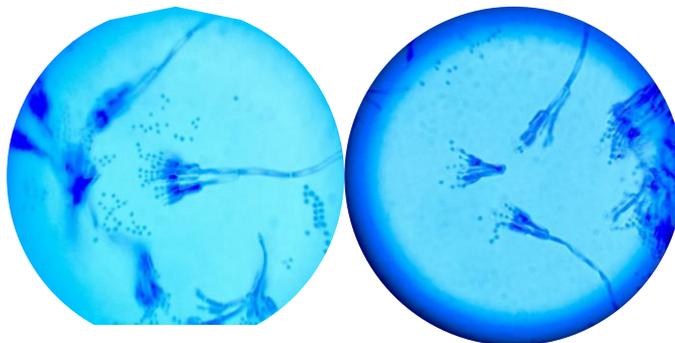


Figura 2-3: *Penicillium* spp al microscopio

Fuente: Verónica Verdezoto. 2017

Según las características descritas, se confirma que el hongo pertenece al género *Penicillium*, tomando en cuenta lo mencionado por Tormo (2014b) en cuanto a la forma del conidio y características macroscópicas se encuentra coincidencias con la especie *Penicillium digitatum*.



Figura 3-3: *Penicillium digitatum*

Fuente: (Tormo, 2014b) *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. (Ascomycetes)

3.1.2.2 Género *Aspergillus*

- Características macroscópicas

Coloración: Al inicio las colonias presentaron coloración blanca. Con el pasar de los días tomaron coloración verde claro. En el reverso de la caja, color crema. Se observaron la formación de estrías en las colonias.

Bordes: Bordes difusos de color blanco.

Textura: Al principio de aspecto algodonoso. Con el pasar de los días tomaron un aspecto pulvurulento.

Tipo de micelio: No presentan micelio aéreo.

Característica especial: Formación de esclerocios en algunas cajas.

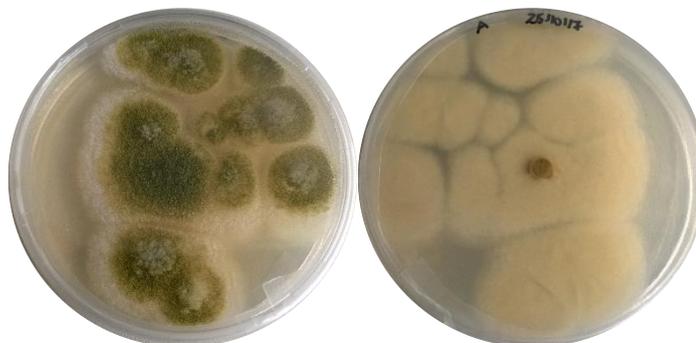


Figura 4-3: Cultivo hongo *Aspergillus* spp

Fuente: Verónica Verdezoto. 2017

- *Características microscópicas*

Se observaron conidióforos con cabezas y vesículas globosas coincidentes con una de las cuatro formas básicas (globosa, radiada, columnar o claviforme) mencionadas por Carrillo (2015c) para las cabezas conidiales del género *Aspergillus*.

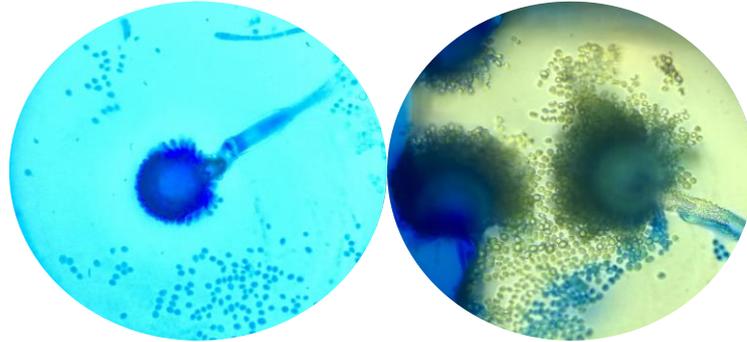


Figura 5-3: *Aspergillus* spp al microscopio

Fuente: Verónica Verdezoto. 2017

Por las características descritas, se confirma la pertenencia del hongo al género *Aspergillus*. De acuerdo a las descripciones realizadas por Carrillo (2015c) y Tormo (2014a) se encuentran coincidencias con la especie *Aspergillus flavus*.



Figura 6-3: *Aspergillus flavus*

Fuente: (Tormo, 2014a) *Aspergillus flavus* Link (Ascomycetes)

3.1.2.3 Género *Fusarium*

- *Características macroscópicas*

Coloración: Colonias de color blanco. Con el pasar del tiempo, se observó una coloración roja intensa al reverso de la placa.

Bordes: Colonias con bores definidos.

Textura: De apariencia algodonosa.

Tipo de micelio: Micelio aéreo.

Característica especial: Colonias de crecimiento rápido, a los cinco días llenaron la caja.



Figura 7-3: Cultivo hongo *Fusarium* spp

Fuente: Verónica Verdezoto. 2017

- *Características microscópicas*

Se observaron macroconidios curvados, pluriseptados, con terminaciones más o menos puntiagudas coincidentes con las descripciones realizadas por Carrillo (2015b) para el género *Fusarium*

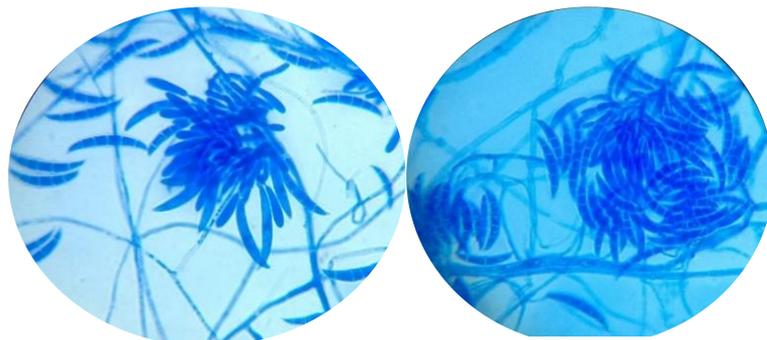


Figura 8-3: *Fusarium* spp al microscopio

Fuente: Verónica Verdezoto. 2017

Por las características descritas anteriormente se confirma que el hongo estudiado pertenece al género *Fusarium*. De acuerdo a lo descrito por Thiribhuvanamala (2015) y Carrillo (2015b) se confirma la especie *Fusarium oxysporum*.

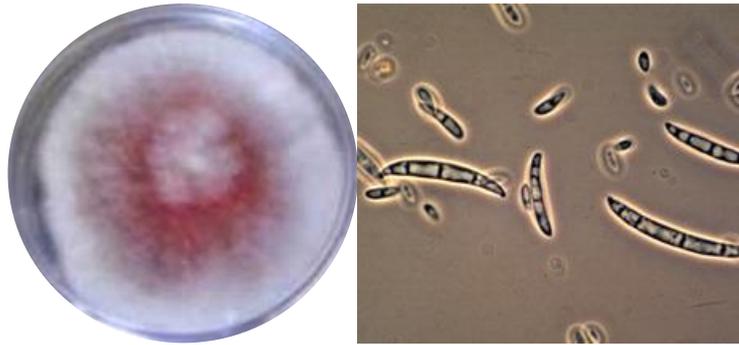


Figura 9-3: *Fusarium oxysporum*

Fuente: (Thiribhuvanamala, 2015) Panama Wilt: *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense*

3.1.3 Determinación de actividad lipolítica

Los hongos sembrados en agar base Tributirina con mantequilla presentaron un crecimiento semejante al que tuvieron en agar PDA. Se observaron diferencias en la coloración que tomaron las colonias en el medio de cultivo con mantequilla atribuible a la presencia de triacilglicéridos que causan la modificación de sus características macroscópicas.

Los hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* presentaron cambios notables en su coloración siendo sus colores más opacos respecto a sus colonias desarrolladas en agar PDA. El hongo *Fusarium oxysporum* presentó un crecimiento rápido.

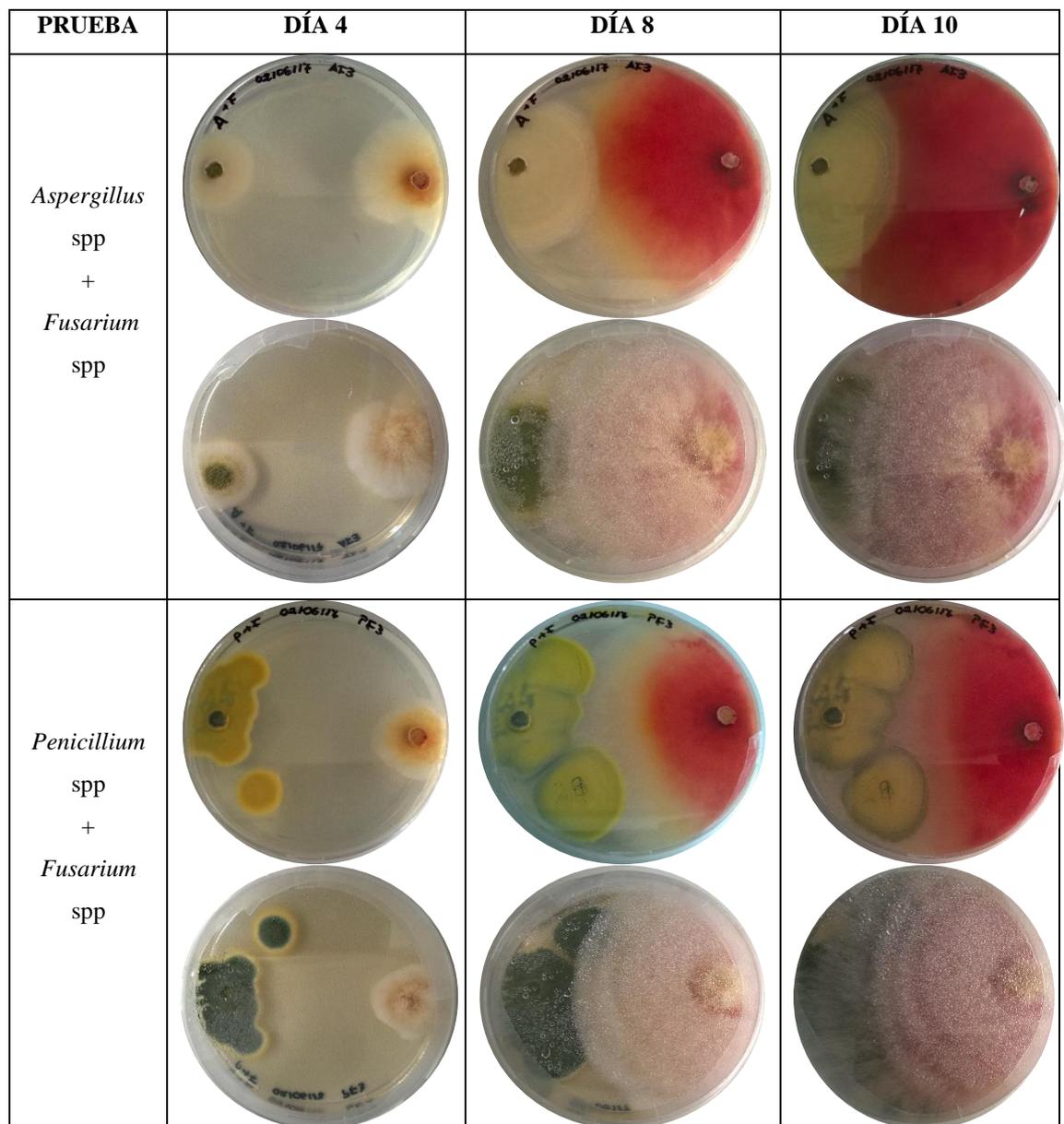
Pasado el tiempo de prueba, se observó aclaramiento en el medio de cultivo, lo que confirma actividad lipolítica para los hongos estudiados. Esto coincide con estudios realizados por Coca et al (2001), Ruiz y Sánchez (2001) y Castillo (2013) donde se menciona que estos hongos son productores de lipasas.

Las pruebas de actividad lipolítica para las levaduras aisladas del agua residual dieron resultados negativos puesto que, aunque se observó crecimiento en los medios de cultivo no se visualizaron halos de aclaramiento alrededor de las colonias.

3.1.4 Pruebas de antagonismo

De acuerdo a la escala de clases de Bell et al. (1982, p. 379) todas las pruebas se ubican en la clase 3 debido a que cada hongo presentó un crecimiento normal hasta tocar al otro aproximadamente en la mitad de la placa. El primer toque se observó al octavo día en las pruebas de *Penicillium* spp + *Fusarium* spp y *Aspergillus* spp + *Fusarium* spp y al séptimo día en las pruebas de *Aspergillus* spp + *Penicillium* spp.

Al finalizar la prueba, se observó crecimiento total de cada hongo en su sector de la caja sin mostrar dominancia uno sobre otro. La evolución de las pruebas de antagonismo se observa en la Figura 10-3.



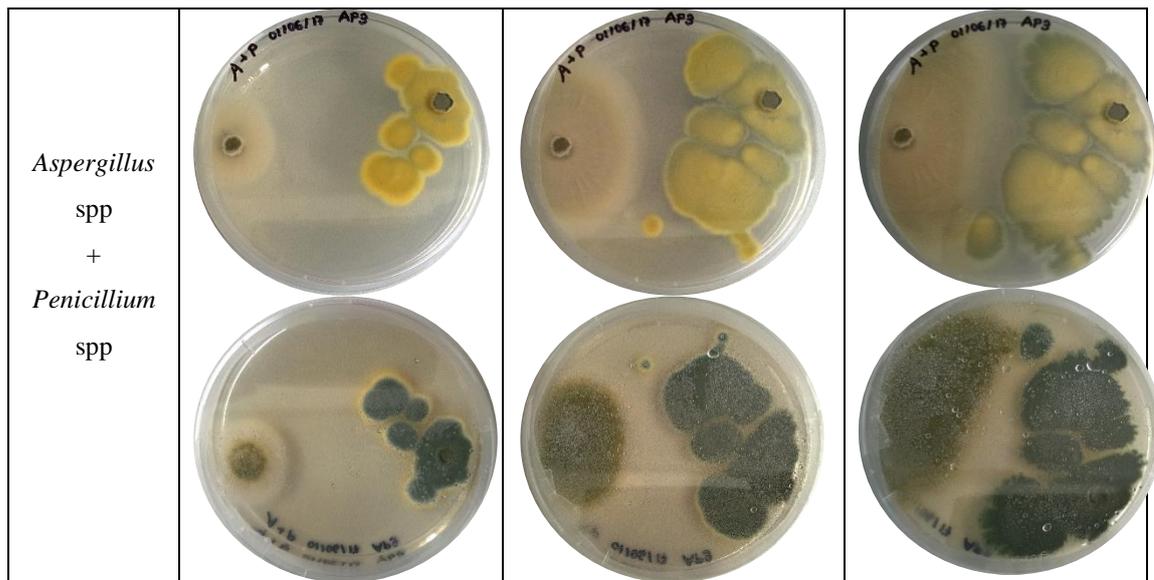


Figura 10-3: Pruebas de antagonismo

Fuente: Verónica Verdezoto. 2017

Se descarta antagonismo por micoparasitismo y antibiosis debido a que no se presentó en ninguna prueba el crecimiento del micelio de un hongo sobre otro ni la formación de halos de inhibición entre las colonias enfrentadas (Fernández y Suárez, 2009, p. 4746). Sin embargo, a partir del octavo día, se observó crecimiento del micelio de *Fusarium* spp por encima de los hongos *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp pero nunca llegó a crecer sobre ellos. Esto se atribuye a características propias de los hongos pertenecientes al género *Fusarium*.

En estudios realizados por Arenas et al (2013) y Quiroz et al (2008) se mencionan porcentajes bajos de actividad antagonica por inhibición de crecimiento de algunas especies del género *Aspergillus* hacia hongos del género *Fusarium* y *Penicillium*, de igual manera Roselló (2003) menciona a pocas especies de *Penicillium* capaces de influir sobre la tasa de crecimiento de *Fusarium oxysporum*, sin embargo, este comportamiento no se observó en las pruebas realizadas durante la investigación debido a las distintas características que presenta cada especie, según Ulacio et al (2002), los hongos *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp y *Fusarium* spp son capaces de desarrollarse juntos sobre un mismo sustrato.

Por la capacidad que presentaron los hongos para crecer de manera conjunta se eligió elaborar un inóculo mixto con los tres géneros estudiados.

3.1.5 Preparación del inóculo de *Aspergillus spp*, *Penicillium spp* y *Fusarium spp*

Tras un serie de pruebas preliminares se seleccionó el volumen de 100ml de caldo para realizar la masificación de los hongos *Aspergillus spp* y *Penicillium spp*. Esto debido a que el número de esporas obtenido tras el crecimiento de los hongos por cinco días a 25°C y en el volumen seleccionado permitió un ajuste a una concentración inicial aproximada de 1×10^6 esporas/ml, valor recomendado por Gonçalves et al (2009) y Coca et al (2001) para pruebas de degradación de aceites y grasas en aguas residuales y producción de enzimas lipasas, respectivamente.



Figura 11-3: Masificación de *Aspergillus spp* y *Penicillium spp*

Fuente: Verónica Verdezoto. 2017

La masificación de *Fusarium spp* se llevó a cabo en 90 cajas con agar PDA debido a que no se lograron obtener conteos de esporas significativos en cultivos desarrollados en caldo papa y dextrosa a pesar de los resultados favorables reportados por Suárez (2001) en cultivos de *Fusarium spp* en medio líquido PDB (Potato Dextrose Broth) sometidos a agitación constante, a 30°C en condiciones de oscuridad durante 5-7 días. Se aplicaron dichas condiciones en pruebas previas pero se encontró dificultad para el conteo de esporas, tomando en cuenta lo mencionado por Villanueva et al (2013) este hecho puede atribuirse a la baja producción de biomasa de *Fusarium spp* en cultivos líquidos.



Figura 12-3: Masificación de *Fusarium spp*

Fuente: Verónica Verdezoto. 2017

3.1.6 *Conteo de esporas*

Las medias de esporas/ml obtenidas tras el proceso de masificación y conteo de esporas para cada hongo se reporta en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3: Resultados conteo de esporas

HONGO	RANGO ESPORAS (esporas/ml)	MEDIA ESPORAS (esporas/ml)
<i>Aspergillus</i> spp	$7,7 \times 10^6 - 1,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
<i>Penicillium</i> spp	$6,6 \times 10^6 - 1,2 \times 10^7$	$7,8 \times 10^6$
<i>Fusarium</i> spp	$5,0 \times 10^4 - 7,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

La concentración de esporas de *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp dieron una concentración inicial en el agua residual aproximada a 1×10^6 esporas/ml. El conteo de esporas para el hongo *Fusarium* spp fue baja debido a características propias del género por las cuales no se llegan a obtener macroconidios en altas cantidades en comparación con los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* que se caracterizan por su alta producción de esporas.

La concentración inicial del agua residual a partir de las soluciones de esporas de *Fusarium* spp llegaron a valores aproximados a 1×10^4 esporas/ml, valor que se asemeja a la concentración usada por Herrera y Laurentín (2012) para la inoculación del hongo sobre sustratos orgánicos.

3.1.7 *Eficiencia degradativa de aceites y grasas*

Con un análisis univariante se buscó saber si existían diferencias en la concentración de aceites y grasas por efecto de los tratamientos aplicados. El resultado del Test se muestra en la Tabla 4-3.

Tabla 4-3: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	12975753,805 ^a	7	1853679,115	8,228	,000
Intersección	46580232,600	1	46580232,600	206,762	,000
Tratamiento	10392448,667	4	2598112,167	11,533	,000
Días	2583305,139	3	861101,713	3,822	,015
Error	11714796,155	52	225284,541		
Total	71270782,560	60			
Total corregida	24690549,960	59			

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

a. R cuadrado = ,526 (R cuadrado corregida = ,462)

Planteamiento de la hipótesis

H₀: No existen diferencias significativas en la concentración de aceites y grasas por efecto de los tratamientos aplicados $p \geq 0,05$

H₁: Existen diferencias entre las concentraciones de aceites y grasas por efecto de los tratamientos aplicados. Al menos una muestra es diferente $p < 0,05$

Decisión

Estadísticamente se rechaza la hipótesis nula porque el nivel de significancia es menor a 0,05 ($p=0,000$). Se acepta la hipótesis alternativa (H_1) lo que significa que existen diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de aceites y grasas por lo que al menos un tratamiento aplicado es diferente. Se justifica realizar pruebas Post-Hoc para encontrar subconjuntos homogéneos y realizar comparaciones.

La Tabla 5-3 muestra los subconjuntos de acuerdo a las medias de las concentraciones de aceites y grasas respecto a los tratamientos aplicados.

Tabla 5-3: Subconjuntos homogéneos para aceites y grasas (mg/l) respecto a los tratamientos

Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
Duncan ^{a,b} Mixto	12	361,9000		
Aspergillus spp	12	735,2000	735,2000	
Penicillium spp	12	755,7667	755,7667	
Control	12		924,8333	
Fusarium spp	12			1627,8000
Sig.		,059	,362	1,000

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 225284,541.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000

b. Alfa = 0,05.

El análisis de Duncan para las medias de las concentraciones de aceites y grasas (mg/l) respecto a los tratamientos aplicados, muestra homogeneidad entre las medias obtenidas en los tratamientos Mixto, *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp, así como entre las medias de los tratamientos *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp y el control. El tratamiento *Fusarium* spp presenta una media diferente a los demás tratamientos.

Los tratamientos que presentan menores concentraciones del contaminante en estudio son los tratamientos Mixto, *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp siendo el tratamiento Mixto el que reporta la menor concentración de aceites y grasas (mg/l) como se observa en el Gráfico 1-3.

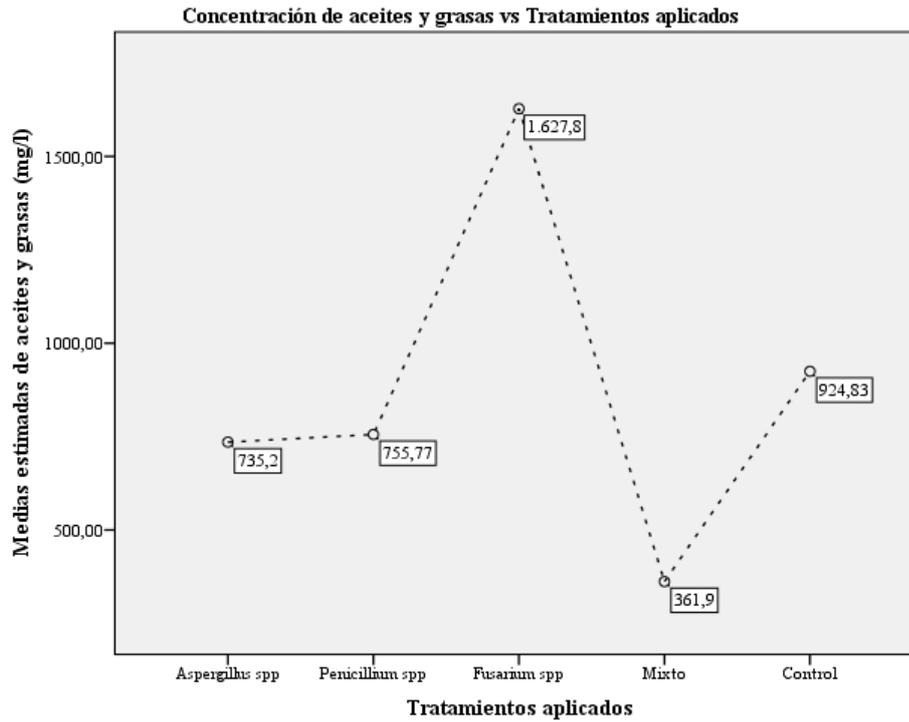


Gráfico 1-3: Concentración de aceites y grasas vs Tratamientos aplicados

Realizado por: Verónica Verdezoto, 2017

Los subconjuntos formados entre la concentración de aceites y grasas respecto a los días cuando se realizaron los controles se muestran en la Tabla 6-3.

Tabla 6-3: Subconjuntos homogéneos para aceites y grasas (mg/l) respecto al tiempo

	Días	N	Subconjunto	
			1	2
Duncan ^{a,b}	Día 17	15	594,3733	
	Día 10	15	788,8533	788,8533
	Día 3	15		1000,9867
	Día 5	15		1140,1867
	Sig.			,267

Realizado por: Verónica Verdezoto, 2017

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 225284,541.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 15,000

b. Alfa = 0,05.

La prueba de Duncan para la concentración de aceites y grasas (mg/l) respecto a los días de tratamiento transcurridos, muestra homogeneidad entre las medias de aceites y grasas en los días 3,5 y 10 así como en los días 10 y 17. La menor concentración de aceites y grasas se encuentra en los días 10 y 17 siendo el día 17 cuando hubo la menor concentración como se observa en el Gráfico 2-3.

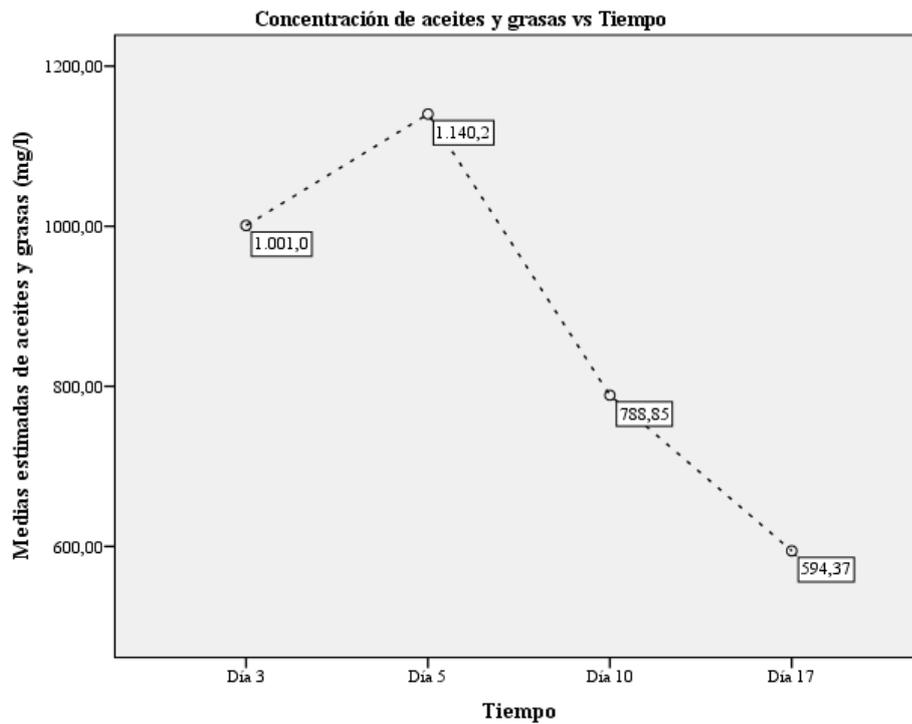


Gráfico 2-3: Concentración de aceites y grasas vs Tiempo

Realizado por: Verónica Verdezoto, 2017

De acuerdo al análisis comparativo, la mayor reducción de aceites y grasas se dio con el tratamiento Mixto al día 17.

En el Gráfico 3-3 se presenta el comportamiento de los aceites y grasas a lo largo del tiempo de experimentación de acuerdo al tratamiento. La línea horizontal segmentada muestra el valor inicial del parámetro, se observa una disminución progresiva en la concentración de aceites y grasas en los tratamientos *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp y el tratamiento Mixto. Se observa además un incremento en la concentración de los aceites y grasas al quinto día de experimentación en los tratamientos *Fusarium* spp y el control, este comportamiento puede deberse a un incremento de peso por absorción de oxígeno en los recipientes usados en la extracción (IDEAM, 2007, p. 3).

Reducción de aceites y grasas en el agua residual

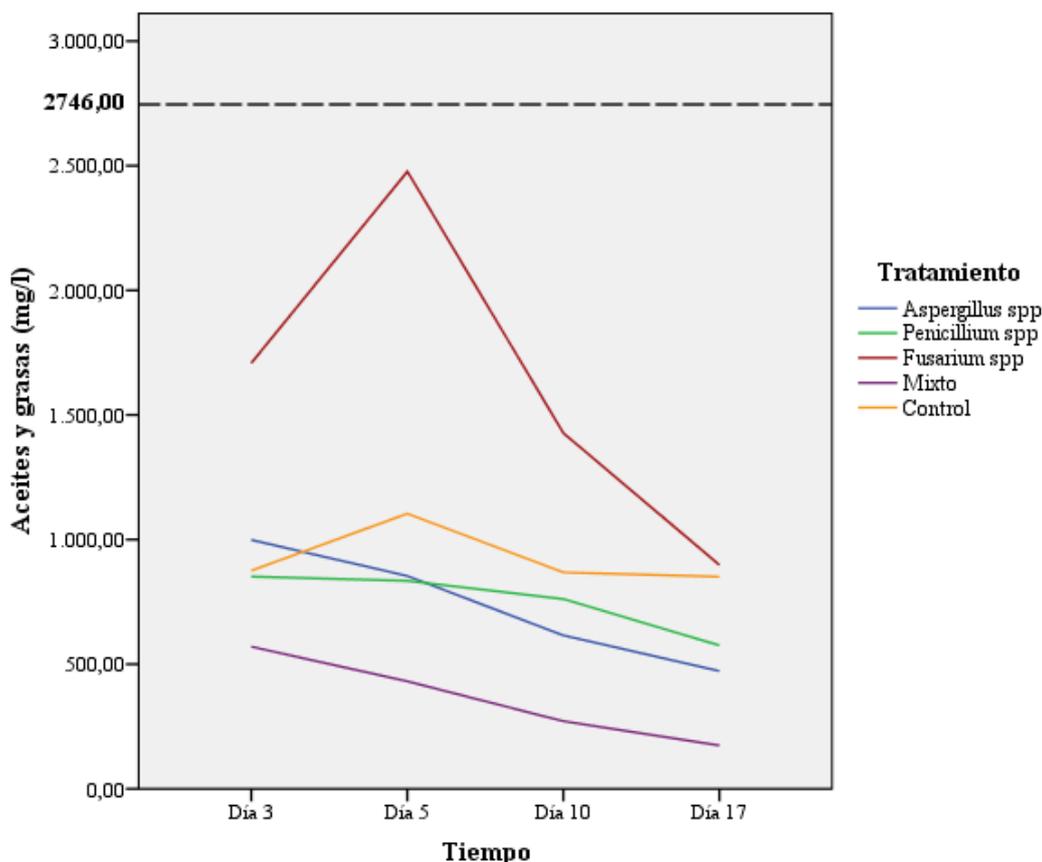


Gráfico 3-3: Reducción de aceites y grasas en el agua residual

Realizado por: Verónica Verdezoto, 2017

Todos los tratamientos, incluido el control redujeron la concentración de aceites y grasas. Los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de reducción fueron *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp y el tratamiento Mixto con 73%, 72% y 87% respectivamente. El tratamiento con *Fusarium* spp redujo la concentración de aceites y grasas en un 41%, lo que confirma la hipótesis que el tratamiento biológico con hongos permite la degradación de aceites y grasas en aguas residuales generadas en queseras de tipo artesanal. El tratamiento control llegó a una reducción del 66%, sin embargo, se observa que la reducción del parámetro no fue progresiva con el pasar del tiempo.

Los porcentajes obtenidos se asemejan a los resultados reportados por Agualimpia (2013) y Bhumibhamon et al (2002) quienes mencionan un 72% y 73%-88% de reducción en la concentración de aceites y grasas. Dichas investigaciones se realizaron usando consorcios de bacterias y levaduras con actividad lipolítica sobre aguas residuales ricas en materia grasa.

Los porcentajes de degradación de aceites y grasas presentados por los tratamientos *Aspergillus* spp, y *Penicillium* spp confirman lo resultados expuestos por Coca et al (2001), Ruiz y Sánchez (2001) y Favela et al (2011) quienes señalan a estos géneros como buenos productores de enzimas lipasas. El tratamiento con *Fusarium* spp fue el que menor porcentaje de degradación de aceites y grasas presentó, aunque el hongo tuvo un buen crecimiento en medio sólido suplementado con grasa animal, el comportamiento no se replicó en las unidades experimentales, esto puede atribuirse a la dificultad presentada por el hongo para crecer en medio de cultivo líquido.

La reducción de aceites y grasas en el tratamiento control alcanzó el 66%. Debido a que las unidades experimentales se sometieron a aireación constante, la disminución de aceites y grasas pudo haberse dado por la capacidad de los triacilglicéridos de oxidarse rápidamente en presencia de oxígeno. Aunque hubo crecimiento de levaduras en medio sólido suplementado con un sustrato graso, estas no presentaron actividad lipolítica positiva por lo que se descarta su actividad representativa en los tratamientos de control. Otros microorganismos pudieron ser inhibidos por las condiciones ácidas del agua residual (pH 4) durante el tratamiento. A pesar de que se atribuye la disminución de aceites y grasas en el control al proceso de aireación, a nivel operativo implicaría gastos elevados por mantenimiento de un sistema de aireación a gran escala.

3.1.8 Control crecimiento microbiano

Los resultados de los cultivos del agua residual de las unidades experimentales a los 3, 5, 10 y 17 días de tratamiento se muestran en la Tabla 7-3.

Tabla 7-3: Crecimiento de hongos en las unidades experimentales

	<i>Aspergillus</i> spp	<i>Penicillium</i> spp	<i>Fusarium</i> spp	MIXTO		
				<i>Aspergillus</i> spp	<i>Penicillium</i> spp	<i>Fusarium</i> spp
DÍA 3	ALTO (+++)	ALTO (+++)	MEDIO (++)	ALTO (+++)	ALTO (+++)	BAJO (+)
DÍA 5	MEDIO (++)	ALTO (+++)	BAJO (+)	MEDIO (++)	ALTO (+++)	BAJO (+)
DÍA 10	BAJO (+)	MEDIO (++)	BAJO (+)	BAJO (+)	MEDIO (++)	NO VISIBLE (-)
DÍA 17	NO VISIBLE (-)	BAJO (+)	NO VISIBLE (-)	NO VISIBLE (-)	MEDIO (++)	NO VISIBLE (-)

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

La presencia de los hongos *Aspergillus* spp y *Penicillim* spp fue mayoritaria en comparación con lo visualizado en las cajas con *Fusarium* spp, sin embargo su presencia fue confirmada en el agua residual por aumento de la viscosidad del medio, mismo comportamiento que se presentó cuando se realizaron las pruebas de crecimiento en caldo de papa y dextrosa.

3.1.9 Análisis adicionales

Para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos aplicados y las concentraciones finales de los parámetros DBO₅, DQO, sólidos totales, sólidos disueltos y conductividad se realizaron análisis estadísticos de varianzas con pruebas de comparaciones de medias de Duncan en caso de haber diferencias significativas.

- DBO₅

Tabla 8-3: Prueba ANOVA para DBO₅

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	67498390,267	4	16874597,567	1,080	,417
Intra-grupos	1,563E8	10	15627298,467		
Total	2,238E8	14			

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

Planteamiento de la hipótesis

H₀: No existen diferencias significativas en la concentración de la DBO₅ por efecto de los tratamientos aplicados $p \geq 0,05$

H₁: Existen diferencias entre las concentraciones de la DBO₅ por efecto de los tratamientos aplicados. Al menos dos muestras son diferentes $p < 0,05$

Decisión

Estadísticamente se acepta la hipótesis nula porque el nivel de significancia es mayor a 0,05 ($p=0,417$) por lo tanto, no existen diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅) respecto a los tratamientos aplicados.

En el Gráfico 4-3 se presentan las medias de DBO₅ obtenidas al final de la experimentación para cada tratamiento. La línea horizontal segmentada representa el valor inicial del parámetro, se observa que el tratamiento *Penicillium spp* presentó la menor concentración de DBO₅ lo que corresponde a un porcentaje de reducción del 61%. Los tratamientos *Aspergillus spp*, *Fusarium spp*, Mixto y el Control provocaron una reducción del 52%, 35%, 55% y 34% respectivamente, sin embargo, a nivel estadístico todos los tratamientos generaron resultados similares (medias homogéneas).

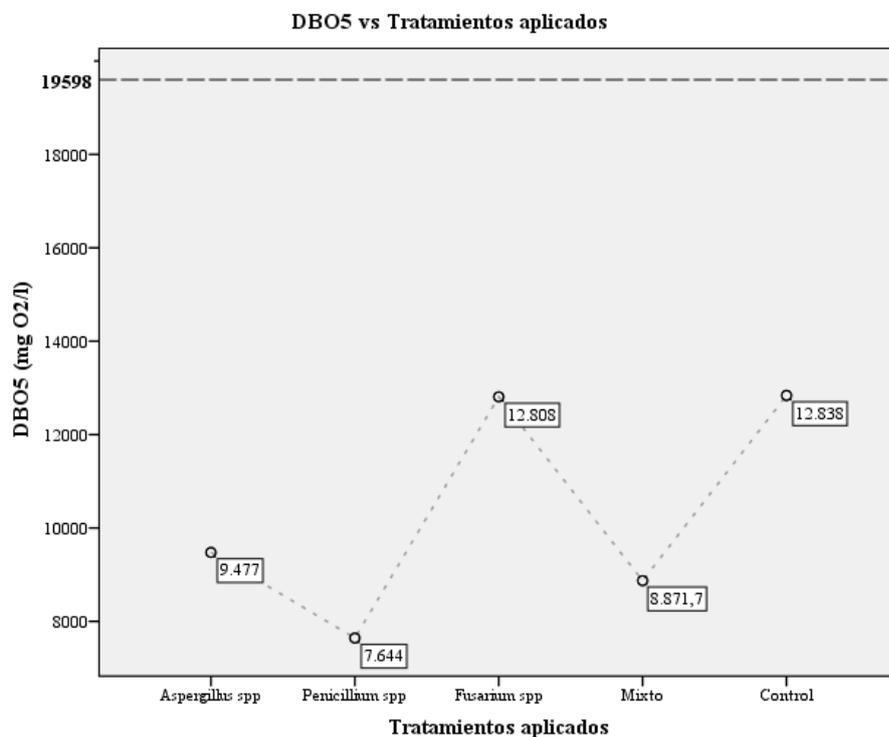


Gráfico 4-3: DBO₅ vs Tratamientos aplicados

Realizado por: Verónica Verdezoto, 2017

- DQO

Tabla 9-3: Prueba ANOVA para DQO

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,076E8	4	51899333,333	1,622	,244
Intra-grupos	3,200E8	10	31998000,000		
Total	5,276E8	14			

Realizado por: Verónica Verdezoto, 2017

Planteamiento de la hipótesis

H₀: No existen diferencias significativas en la concentración de la DQO por efecto de los tratamientos aplicados $p \geq 0,05$

H₁: Existen diferencias entre las concentraciones de la DQO por efecto de los tratamientos aplicados. Al menos dos muestras son diferentes $p < 0,05$

Decisión

Estadísticamente se acepta la hipótesis nula porque el nivel de significancia es mayor a 0,05 ($p=0,244$) por lo tanto, no existen diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) respecto a los tratamientos aplicados.

En el Gráfico 5-3 se exponen las medias de DQO al final de la experimentación de acuerdo a los tratamientos aplicados, la línea horizontal segmentada representa el valor inicial del parámetro. Al igual que la DBO₅, se observa que el tratamiento con *Penicillium* spp presentó la menor DQO al final de la investigación. El porcentaje de reducción para *Penicillium* spp fue del 55% y del 47%, 23%, 44% y 39% para los tratamiento *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, Mixto y Control respectivamente. Aunque se muestran porcentajes de reducción, estos no presentan diferencias significativas a nivel estadístico.

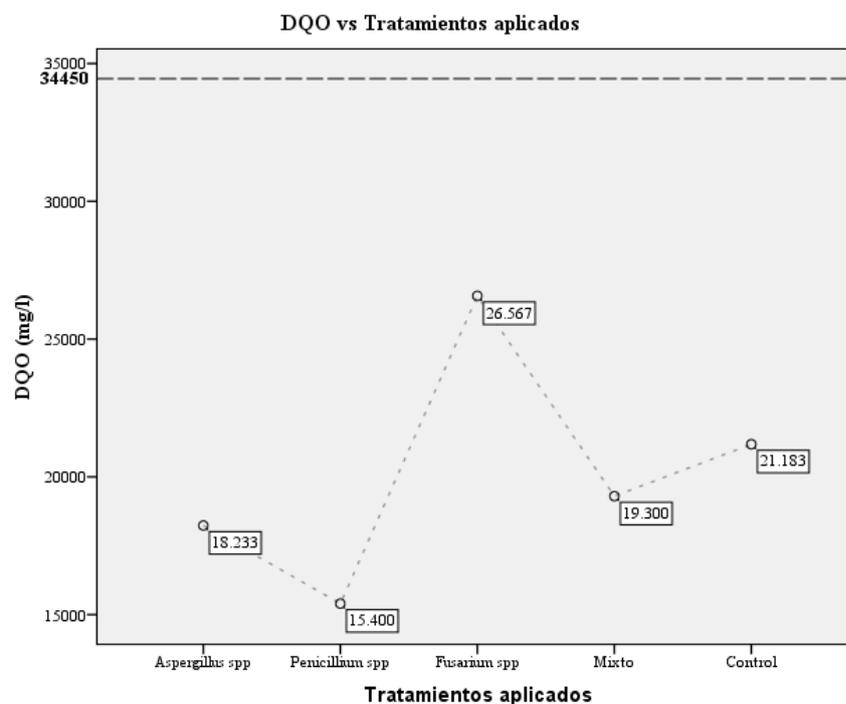


Gráfico 5-3: DQO vs Tratamientos aplicados

Realizado por: Verónica Verdezoto, 2017

Agualimpia (2013) y Bhumibhamon et al (2002) mencionan porcentajes de reducción de materia orgánica expresada como DBO₅ y DQO de hasta un 95%, sin embargo, los porcentajes obtenidos en la presente investigación coinciden con los resultados reportados por Gonçalves et al (2009) quien presenta una reducción de DQO del 53% al 62%. La variación entre los resultados obtenidos se atribuye a la concentración inicial (34450 mg/l) de la muestra estudiada, valor mucho mayor a los trabajados por Agualimpia (2013):4760 mg/l y Bhumibhamon et al (2002): 15000-25000 mg/l.

- *Sólidos totales*

En la Tabla 10-3 se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación del análisis estadístico para sólidos totales.

Tabla 10-3: Prueba ANOVA para sólidos totales

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	33399400,000	4	8349850,000	1,745	,216
Intra-grupos	47839850,000	10	4783985,000		
Total	81239250,000	14			

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

Planteamiento de la hipótesis

H₀: No existen diferencias significativas en la concentración de sólidos totales por efecto de los tratamientos aplicados $p \geq 0,05$

H₁: Existen diferencias entre las concentraciones de sólidos totales por efecto de los tratamientos aplicados. Al menos dos muestras son diferentes $p < 0,05$

Decisión

Estadísticamente se acepta la hipótesis nula porque el nivel de significancia es mayor a 0,05 ($p=0,216$) por lo tanto, no existen diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de sólidos totales respecto a los tratamientos aplicados.

El Gráfico 6-3 muestra las medias de la concentración de sólidos totales alcanzadas al final del período de investigación. La línea horizontal segmentada indica la concentración inicial del parámetro. Se observan medias semejantes entre todos los tratamientos.

Los porcentajes de reducción en sólidos totales fueron del 72%, 66%, 78% y 69% para los tratamientos *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp, *Fusarium* spp, Mixto y Control respectivamente. Sin embargo, estadísticamente no se encuentran diferencias significativas entre las medias obtenidas para sólidos totales en los tratamientos aplicados lo que significa que todos los tratamientos son eficientes.

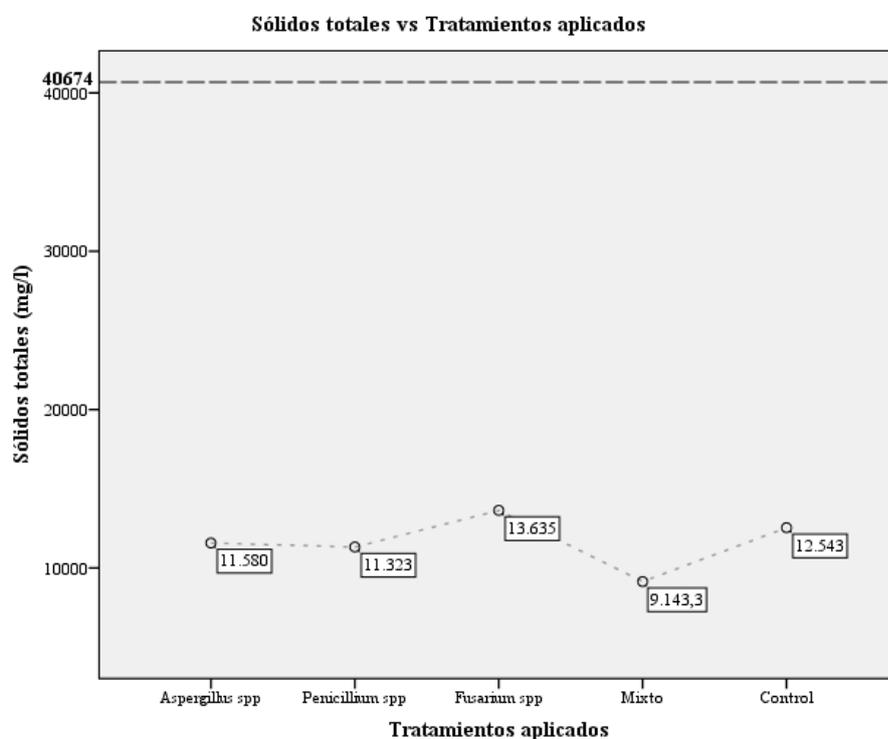


Gráfico 6-3: Sólidos totales vs Tratamientos aplicados

Realizado por: Verónica Verdezoto, 2017

- *Sólidos suspendidos*

La Tabla 11-3 muestra los resultados obtenidos al comparar la concentración final de sólidos suspendidos con los tratamientos aplicados.

Tabla 11-3: Prueba ANOVA para sólidos suspendidos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2417666,000	4	604416,500	2,343	,125
Intra-grupos	2579235,333	10	257923,533		
Total	4996901,333	14			

Realizado por: Verónica Verdezoto. 2017

Planteamiento de la hipótesis

H₀: No existen diferencias significativas en la concentración de sólidos suspendidos por efecto de los tratamientos aplicados $p \geq 0,05$

H₁: Existen diferencias entre las concentraciones de sólidos suspendidos por efecto de los tratamientos aplicados. Al menos dos muestras son diferentes $p < 0,05$

Decisión

Estadísticamente se acepta la hipótesis nula porque el nivel de significancia es mayor a 0,05 ($p=0,125$) por lo tanto, no existen diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de sólidos suspendidos respecto a los tratamientos aplicados.

En el Gráfico 7-3 se observan las medias de las concentraciones finales de sólidos suspendidos en el agua residual, la línea horizontal segmentada representa el valor inicial del parámetro. Se encuentran medias semejantes entre los tratamientos *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Fusarium spp* y el Control. El tratamiento Mixto muestra la menor concentración de sólidos suspendidos, sin embargo, a nivel estadístico no existen diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de sólidos suspendidos al final de la experimentación por lo que no se puede decir que un tratamiento es mejor que otro para reducir a este parámetro, todos son eficientes.

Los porcentajes de reducción calculados para sólidos suspendidos corresponden al 28%, 26%, 22%, 51% y 36% para los tratamientos *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Fusarium spp*, Mixto y Control respectivamente.

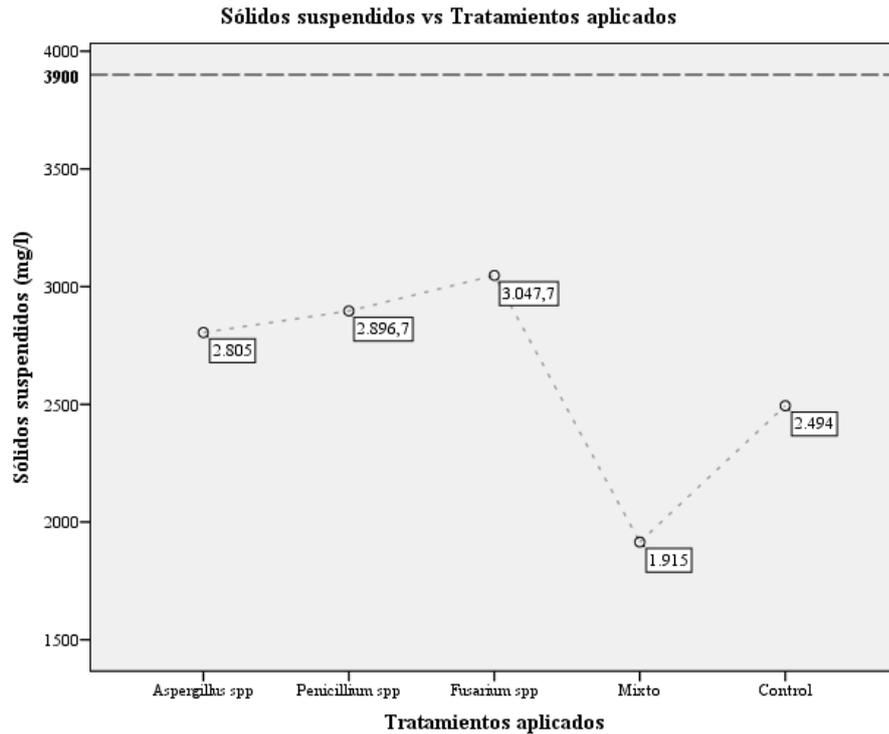


Gráfico 7-3: Sólidos suspendidos vs Tratamientos aplicados

Realizado por: Verónica Verdezoto, 2017

- *Conductividad*

Los valores finales de conductividad en el agua residual mostraron un incremento que fue del 5% al 30%, dicho incremento pudo ser debido al aumento de iones disueltos (Goyenola, 2007) durante el tiempo de la experimentación por la actividad propia de los microorganismos presentes en el agua y por la actividad de los hongos filamentosos inoculados.

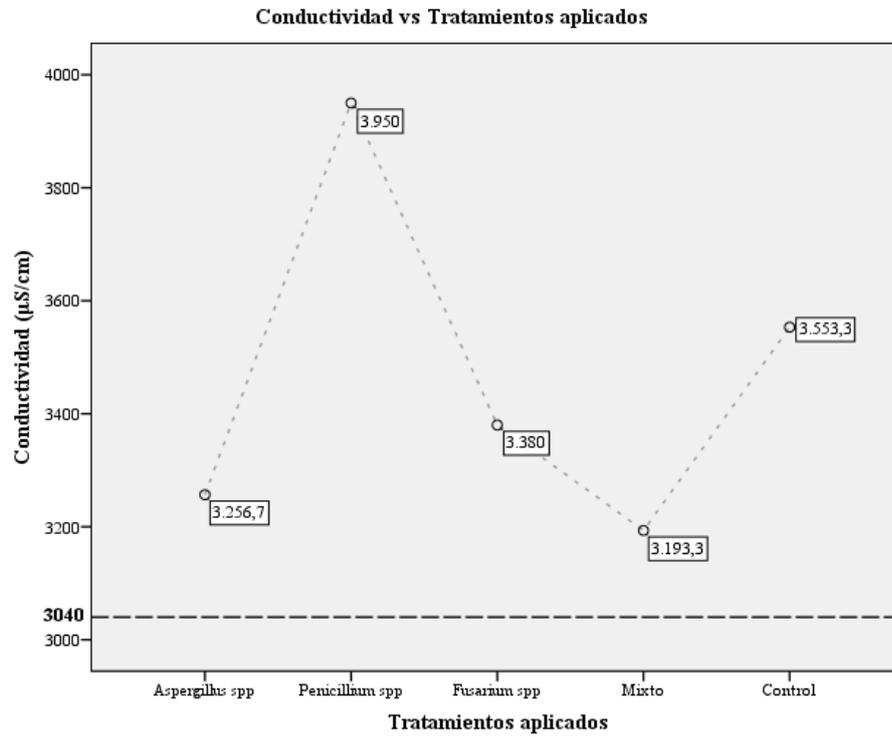


Gráfico 8-3: Conductividad vs Tratamientos aplicados

Realizado por: Verónica Verdezoto, 2017

CONCLUSIONES

- Los parámetros físico-químicos del agua residual presentaron valores de 6,08 para pH, 28°C de temperatura, 3040 $\mu\text{S}/\text{cm}$ de conductividad y concentraciones de 40674 mg/l, 3900 mg/l, 19598 mg/l, 34450 mg/l, 2746 mg/l, 1350 mg/l, 2.4 mg/l, 502 mg/l y 485 mg/l para sólidos totales, sólidos suspendidos, DBO₅, DQO, aceites y grasas, nitratos, nitritos, cloruros y fosfatos respectivamente. Estos valores son semejantes a los reportados por diversos autores para residuales de industrias lácteas dedicadas a la elaboración de quesos. A nivel microbiológico el agua presenta coliformes totales y levaduras en concentraciones variables. No presenta coliformes fecales ni hongos filamentosos.
- Los hongos *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp y *Fusarium* spp no muestran características antagónicas según la escala de clases de Bell (Clase 3) por lo que pueden ser usados en consorcios.
- Los tratamientos biológicos con los hongos *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp y *Fusarium* spp son capaces de reducir la concentración de aceites y grasas en agua residual originada en los procesos de elaboración artesanal de queso. Se logró una reducción del 73%, 72%, 41% y 87% en la concentración de aceites y grasas aplicando los tratamientos *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Fusarium* spp y Mixto, respectivamente.
- Aplicando un análisis univariante usando el paquete estadístico IBM SPSS versión 19 se encontraron diferencias significativas entre las medias de concentraciones de aceites y grasas respecto a los tratamientos aplicados. Por medio de la prueba de comparación de medias de Duncan se determinó que el tratamiento Mixto causa mayor disminución en la concentración del parámetro al término de 17 días.
- Los tratamientos aplicados causaron una disminución en la concentración de DBO₅, DQO y sólidos aunque estadísticamente no presentan diferencias significativas entre ellos.

RECOMENDACIONES

- Realizar una investigación variando las concentraciones de los hongos *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp para determinar si la concentración de esporas mejora la eficiencia del proceso.
- Realizar un estudio sobre el aislamiento de enzimas lipolíticas generadas por los hongos *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp con el objetivo de aplicarlas para la construcción de un biofiltro capaz de ser instalado como parte de la etapa de pretratamiento en pequeñas plantas de tratamiento de aguas residuales con alto contenido graso.
- Tomar en cuenta la temperatura de salida del agua residual en industrias lácteas para la aplicación de pruebas de pilotaje puesto que estas presentan temperaturas entre 28° y 30° C.
- Estudiar la capacidad lipolítica del hongo *Fusarium* ya que aunque se redujo la concentración de aceites y grasas, su aplicación en sustratos líquidos presentó dificultades y la degradación de aceites y grasas obtenida en la experimentación fue menor a la obtenida por los demás tratamientos.

BIBLIOGRAFÍA

ACEVES, A y CASTAÑEDA, L. "Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales". *VITAE Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* [En línea], 2012, (Colombia) Vol. 19(3), pp. 244-247. [Consulta: 24 de Noviembre de 2017] ISSN 2145-2660. Disponible en: <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/viewFile/14331/12607>

AGUAS RESIDUALES (AEMA). *Depuradora de Aguas Residuales industria láctea – Aspectos Medioambientales que todo responsable de calidad debe controlar.* [En línea] 2014. [Consulta: 20 de Febrero de 2017.] Disponible en: <http://aguasindustriales.es/depuradora-de-aguas-residuales-industria-lactea-aspectos-medioambientales-que-todo-responsable-de-calidad-debe-controlar/>.

AGUALIMPIA, B. *Microorganismos con capacidad para degradar las grasas y aceites vegetales presentes en el efluente del proceso de refinación de aceites de C.I. SACEITES S.A.* (Tesis)(Maestría). [En línea] Universidad Industrial de Santander, Santander, Colombia . 2013. p. 84 [Consulta: 28 de Noviembre de 2017]. Disponible en: <http://tangara.uis.edu.co/biblioweb/tesis/2013/147491.pdf>.

ALVARADO, A, et al. *Método de análisis para la determinación de la concentración de grasas y aceites como contaminante en aguas residuales industriales.* [En línea] 2006. [Consulta: 15 de Noviembre de 2017.] Disponible en: congresos.cio.mx/3_enc_mujer/files/extensos/Sesion%204/S4-BYQ17.doc.

APHA. *Standard methods for the examination of water and waste water.* [En línea] 1998. [Consulta: 16 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <https://es.scribd.com/document/229945618/Grasas-y-Aceites-en-Aguas-Por-Particion-Infrarroja-Sm-5520c98>.

ARENAS, Y, TORRES, C y DÍAZ, J. "Identificación de microorganismos antagonistas del hongo *Fusarium* sp. en órganos de *Heliconia* spp". *Ingeniería de Recursos Naturales y del*

Ambiente [En línea], 2013 (Colombia) Vól. 12, pp. 69-78. [Consulta: 25 de Noviembre de 2017.] ISSN 1692-9918. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/2311/231130851007/>

BARBA, L. *Conceptos básicos de la contaminación del agua y parámetros de medición.* [En línea] Universidad del Valle, 2002. [Consulta: 27 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaar/e/fulltext/gestion/conceptos.pdf>.

BARBA, L, RODRÍGUEZ, R y CÓRDOBA, J. *Manual de técnicas microquímicas de campo para la arqueología .* [En línea]. Ciudad de México - México: Instituto de Investigaciones Antropológicas UNAM, 1991. [Consulta: 27 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=ZljCEdk8aUcC&pg=PA24&dq=potencial+de+hidrogeno&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwirsZrsj5fXAhWp64MKHZiMA18Q6AEIJTAA#v=onepage&q=conductividad&f=false>

BASTIDAS, O. *Conteo Celular con Hematocímetro.* [En línea]. Celeromics. s.f. [Consulta: 20 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>.

BELL, D., WELLS, H y MARKHAM, C. "In Vitro Antagonism og Trichoderma species against six fungal plant pathogens". *Phytopathology* [En línea], 1982, (Estados Unidos) Vol. 72(4), pp. 379-382. [Consulta: 27 de Noviembre de 2017.] ISSN: 0031-949X. Disponible en: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04_379.PDF

BEYER, H y WALTER, W. *Manual de Química Orgánica.* Barcelona- España: Reverté, 1987 p. 262.

BHUMIBHAMON, O, KOPRASERTSAK, A y FUNTHONG, S. "Biotreatment of High Fat and Oil Wastewater by Lipase Producing Microorganisms". *Kasetsart Journal (Natural Science)* [En línea], 2002, (Tailandia) Vol. 36, pp. 261-267. [Consulta: 25 de Noviembre de 2017.] ISSN: 2452-316X. Disponible en: http://kasetsartjournal.ku.ac.th/kuj_files/2008/A0804211031517167.pdf

BIKANDI, J, y otros. *Yeast counts in Neubauer improved or Thoma counting chambers.* [En línea] In silico. 2004. [Consulta: 17 de Noviembre de 2017.] Disponible en: http://insilico.ehu.eus/counting_chamber/.

CALVO, M. *Oxidación de los lípidos.* [En línea] s.f. [Consulta: 14 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/lipidos/oxidacion1.html>.

CANNON. *Aspergillus terreus.* [En línea] 2013. [Consulta: 01 de Diciembre de 2017.] Disponible en: <http://fungi.myspecies.info/all-fungi/aspergillus-niger>.

CAÑEDO, V y AMES, T. *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos.* [En línea] CIPOTATO: 2004. [Consulta: 27 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>.

CARRILLO, L. 5. *Penicillium.* [En línea] Los hongos de los alimentos y forrajes: 2015a. [Consulta: 23 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/5penicilios.pdf>.

CARRILLO, L. 6. *Fusarium.* [En línea] Los hongos de los alimentos y forrajes: 2015b. [Consulta: 24 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/6fusarios.pdf>.

CARRILLO, L. 4. *Aspergillus.* [En línea] Los hongos de los alimentos y forrajes: 2015c. [Consulta: 24 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/4aspergilos.pdf>.

CASTILLO, S. *Evaluación de actividad lipolítica en aislamientos de fusarium spp y aplicación de interés nutricional de lipasas microbianas* (Tesis) (Tercer nivel). [En línea] Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. 2013. [Consulta: 20 de Febrero de 2017.] Disponible en:

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11999/CastilloRamirezSindyCarolina2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

CENTRO DE ACTIVIDAD REGIONAL PARA LA PRODUCCIÓN LIMPIA (CAR/PL).

Prevención de la contaminación en la Industria Láctea. [En línea] 2002. [Consulta: 21 de Febrero de 2017.] Disponible en: https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwirm4ijtKfSAhWDQCYKHfAHDvcQFggmMAI&url=http%3A%2F%2Fwww.cprac.org%2Fdocs%2Fflac_es.pdf&usq=AFQjCNF3E-PKJpEsz9I7GCK_DE7Z6rQniQ&bvm=bv.148073327,d.eWE.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO DEL AGUA (CIDTA).

Características de las aguas residuales. [En línea] s.f. [Consulta: 10 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://cidta.usal.es/cursos/ETAP/modulos/libros/Caracteristicas.PDF>.

COCA, J, et al. "Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*". *Biología Aplicada* [En línea], 2011, (Cuba) Vol. 18, págs. 216-220. [Consulta: 17 de Noviembre de 2017]. ISSN 1027-2852. Disponible en: http://elfoscientia.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/2001/18/4/216-220_lipasasfinal.pdf

CONDORCHEM ENVITECH.

Tratamiento de aguas residuales de la industria láctea. [En línea] Condorchem Envitech: 2015. [Consulta: 15 de Noviembre de 2016.] Disponible en: <http://blog.condorchem.com/tratamiento-de-aguas-residuales-de-la-industria-lactea/>.

d'ALEO, F. *Penicillium spp su Sabouraud Agar.* [En línea] 2013. [Consulta: 26 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <https://artmicrobes.wordpress.com/2013/11/10/penicillium-spp-on-sabouraud-agar/>.

d'ALEO, F. *Fusarium oxysporum su Sabouraud Agar.* [En línea] 2014. [Consulta: 17 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <https://artmicrobes.wordpress.com/?s=Fusarium>.

DURAN, M y MOSQUERA, P. *Actividad biocontroladora de hongos de suelo sobre microorganismos fitopatógenos* (Tesis)(Tercer nivel). [En línea]. Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador. 2007. p. 36 [Consulta: 25 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=EX8zAQAAMAAJ&pg=PA36&lpg=PA36&dq=solucion%20de%20esporas&source=bl&ots=FHy43Fqeca&sig=pIuPgLhjMW9wOd9QkWN5FLPMH6E&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjuuoPdkLvUAhWFYyYKHc6TDi8Q6AEIVjAI#v=onepage&q=solucion%20de%20esporas&f=false>.

ESCUELA ORGANIZACIÓN INDUSTRIAL (EOI) . *Los vertidos del sector lácteo*. [En línea] 2008. [Consulta: 22 de Febrero de 2017.] Disponible en: http://api.eoi.es/api_v1_dev.php/fedora/asset/eoi:48159/componente48157.pdf.

ESPIGARES, M y PÉREZ, J. *Aguas residuales composición*. [En línea] s.f. [Consulta: 06 de noviembre de 2017.] Disponible en: http://cidta.usal.es/cursos/EDAR/modulos/Edar/unidades/LIBROS/logo/pdf/Aguas_Residuales_composicion.pdf.

FERNÁNDEZ, R y SUÁREZ, C. "ANTAGONISMO IN VITRO DE *Trichoderma harzianum* Rifai SOBRE *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* EN MARACUYÁ (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) DEL MUNICIPIO ZONA BANANERA COLOMBIANA." *Revista Facultad Nacional de Agronomía* [En línea], 2009, (Colombia) Vol. 62(1), pp. 4743-4748 [Consulta: 15 de Noviembre de 2017.] ISSN 0304-2847 Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472009000100001

FAVELA, E, et al. *Caracterización y aplicaciones de biocatalizadores con actividad lipasa producidos por fermentación en medio sólido*. [En línea] SMBB: 2011. [Consulta: 28 de Noviembre de 2017.] Disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/simposios/SimposioVI_Favela.pdf.

FERNÁNDEZ, B y FERNÁNDEZ, F. *Miniqueserías artesanales modernas*. [En línea] MAPA España: s.f. [Consulta: 20 de Febrero de 2017.] Disponible en: http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1992_09.pdf.

FLORES, I, GARCÍA, V y QUIRASCO, M. *Aislamiento e identificación de microorganismos lipolíticos del queso cotija*. [En línea] SMBB: 2003. [Consulta: 27 de Enero de 2017.] Disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_VI/CARTELES/CVI-5.pdf.

GEERLOF, A. *M9 mineral medium*. [En línea] Helmholtz Center Munich: 2010. [Consulta: 27 de Noviembre de 2017.] Disponible en: https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/Protocols/M9-medium_150510.pdf.

GONÇALVES, C, et al. "Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts". *Bioresource Technology*. [En línea], 2009, (Portugal) Vol. 100 (15), pp. 3759-3763. [Consulta: 27 de Noviembre de 2017.] ISSN: 0960-8524. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/09608524/100/15>

GONZÁLEZ, J, MORENO, V y DEL MONTE, A. "Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial". *Revista Colombiana de Biotecnología* [En línea], 2010, (Colombia) Vol. 12(1), pp. 124-140. [Consulta: 24 de Noviembre de 2017.] ISSN 1909-8758. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/15574>

GOYENOLA, G. *Conductividad*. [En línea] Asociación Civil Investigación y Desarrollo: 2007. [Consulta: 08 de Noviembre de 2017.] Disponible en: http://imasd.fcien.edu.uy/difusion/educamb/propuestas/red/curso_2007/cartillas/tematicas/Conductividad.pdf.

HERRERA, I y LAURENTIN, H. "Evaluación de la esporulación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* en dos medios de cultivo y dos metodologías de inoculación en ajonjolí (*Sesamum*

indicum)". *Revista Científica UDO Agrícola* [En línea], 2012, (Venezuela) Vol. 12(3), pp. 639-643. [Consulta: 28 de Noviembre de 2017.] ISSN-e 1317-9152. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4689960>

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES

(IDEAM). *Determinación de grasas y aceites en aguas por el método SOXHLET.* [En línea]

2007. [Consulta: 17 de Noviembre de 2017.] Disponible en:

<http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Grasas+y+Aceites+en+agua+por+m%C3%A9todo+Soxhlet..pdf/15096580-8833-415f-80dd-ceaa7888123d>.

INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE (ISPCH). *Procedimiento recuento mohos y*

levaduras en alimentos. [En línea] 2008. [Consulta: 24 de Noviembre de 2017.] Disponible en:

http://www.ispch.cl/lab_amb/doc/microbiologia_alimentos/PRT-031.pdf.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD-PERÚ (INS). *Manual de procedimientos y técnicas de*

laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis

humanas. [En línea] 2010. [Consulta: 28 de Noviembre de 2017.] Disponible en:

<http://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2010/myl109-10e.pdf>.

INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO (INSHT).

Aspergillus spp. [En línea] 2012. [Consulta: 19 de Noviembre de 2017.] Disponible en:

<http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Ficha%20Aspergillus%20spp.pdf>.

LERMANN, B, et al. *Técnicas analíticas para grasas.* [En línea] 2007. [Consulta: 16 de

Noviembre de 2017.] Disponible en:

http://www.fiq.unl.edu.ar/gir/archivos_pdf/tecnicas_analiticas_Grasas.pdf.

LIFE. *Fungal infections.* [En línea] Leading International Fungal Education: s.f. [Consulta: 20

de Noviembre de 2017.] Disponible en: [http://www.life-worldwide.org/esp/fungal-](http://www.life-worldwide.org/esp/fungal-diseases/aspergillus-terreus)

[diseases/aspergillus-terreus](http://www.life-worldwide.org/esp/fungal-diseases/aspergillus-terreus).

LÓPEZ, L, et al. "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología". *Revista Investigación en discapacidad* [En línea], 2014, (México) Vol. 3(1), pp. 10-18. [Consulta: 27 de Noviembre de 2017.] ISSN 2007-6452. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>

MADIGAN, M, MARTINKO, J y PARKER, J. *Brock Biología de los microorganismos*. 10ma Ed. Ciudad de México-México: Pearson Prentice Hall, 2003.

MAGRO, P. *La industria láctea es una de las más contaminantes en España*. [En línea] Conserva tu Planeta: 2011. [Consulta: 10 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <https://conservatuplaneta.com/2011/11/23/industrialactea/>.

McFADDIN, J. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires-Argentina: Panamericana, 2003. [Consulta: 02 de Noviembre de 2017.] Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=FYWSzy7EjR0C&pg=PA267&lpg=PA267&dq=hidr%C3%B3lisis+de+lipidos&source=bl&ots=ROJOTdJcOo&sig=BZwhHn4rcYQf1J_rOS3DX5sZ5qs&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjrotjWzYXXAhULQyYKHWzyCoAQ6AEIXTAL#v=onepage&q=hidr%C3%B3lisis%20de%20lipidos&f=false

MENDOZA, L. Aislamiento y selección de hongos lipolíticos a partir de aceites vegetales de desechos (provenientes de frituras) utilizados en la elaboración de biosiesel (Tesis) (Tercer nivel). [En línea] Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 2010. [Consulta: 13 de Noviembre de 2016.] Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/872/1/Mendoza_cl.pdf.

MENDOZA, L, et al. "Evaluación de la actividad lipolítica de hongos sobre aceite de higuera (ricinus communis)". *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química* [En línea], 2014, (Perú) Vol. 15(1), pp. 5-10 [Consulta: 22 de Febrero de 2017.] ISSN 1609-7599. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/viewFile/4751/3823>

NORTH CAROLINA PUBLIC HEALTH (NCPH). *Protéjase de las bacterias coliformes en su pozo.* [En línea] EPI: 2009. [Consulta: 25 de Noviembre de 2017.] Disponible en: http://epi.publichealth.nc.gov/oeo/docs/Las_Bacterias_Coliformes_WellWaterFactSt.pdf.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). *Manual de Biogas.* [En línea] 2011. [Consulta: 14 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/019/as400s/as400s.pdf>.

OROZCO, M. Un tercio de la producción láctea se dedica al queso. *REVISTA LÍDERES.* 16 de Febrero de 2015.

PARRA, R. "Lactosuero: importancia en la industria de alimentos". *Revista Facultad Nacional de Agronomía* [En línea], 2009, (Colombia) Vol. 62(1), pp. 4967-4982. [Consulta: 20 de Febrero de 2017.] ISSN: 0304-2847. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a21v62n1.pdf>

PEÑA, R y PÁEZ, J. *Guía para el cálculo de la concentración del inóculo.* [En línea] Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia: 2014. [Consulta: 26 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://virtual.uptc.edu.co/ova/fito/archivo/guia1.pdf>.

PORTO, A. *Tema 6: Lípidos.* [En línea] BIONOVA: s.f. [Consulta: 14 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://www.bionova.org.es/biocast/documentos/tema06.pdf>.

QUIROZ, V, et al. "Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo". *Revista Mexicana de Micología* 2008, (México) Vol. 26, pp. 27-34. [Consulta: 27 de Noviembre de 2017]. ISSN 0187-3180. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018731802008000100005&script=sci_arttext&lng=es

RIVERA, C y GARCÍA, F. "Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite ". *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería* [En línea], 2007, (México) Vol.

11(2), pp. 37-45. [Consulta: 25 de Noviembre de 2017.] ISSN 0188-4786. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2007_2/Enzimas_Aceite.pdf

RODRIGUEZ, P. 2011. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. *Aislamiento e identificación de cepas microbianas como potenciales agentes para biorremediación de efluentes en una extractora de palma aceitera*. [En línea] Riobamba, Ecuador de (Tesis)(Tercer nivel) de 2011. [Citado el: 16 de Noviembre de 2016.] <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/1653/1/236T0055.pdf>.

ROJANO, B. *Oxidación de lípidos y antioxidantes*. [En línea] Universidad Nacional de Colombia: 1997. [Consulta: 15 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8413/1/6884161.1997.pdf>.

ROMERO, J. *Calidad del agua*. 3ra. Ed. Bogotá-Colombia: Escuela Colombiana de Ingeniería, 2009.

ROSAS, J. *Aislamiento y caracterización de un hongo productor de enzimas lipolíticas* (Tesis) (Tercer nivel) [En línea]. Universidad Veracruzana, Veracruz, México. 2015. [Consulta: 27 de Enero de 2017.] Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/40137/1/rosasduranjulio.pdf>.

ROSELLÓ, J. *Capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum* Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai Estudios ecofisiológicos* (Tesis)(Doctoral). [En línea]. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España. p. 262. [Consulta: 27 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/2905/tesisUPV1934.pdf>

RUIZ, B y SÁNCHEZ, S. *La secuencia n-terminal de la lipasa de *Penicillium candidum* forma parte de un grupo estructural diferente al de *Rhizomucor miehei**. [En línea] SMBB: 2001. [Consulta: 27 de Noviembre de 2017.] Disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XIV/OXIV-5.pdf.

SANCHÍS, V, et al. "Diferencias morfológicas y enzimáticas entre cepas de *Aspergillus flavus* productoras y no productoras de aflatoxinas". [En línea] 1984, Vol. 1. [Consulta: 09 de Noviembre de 2017.] Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/39502604_Diferencias_morfologicas_y_enzimas_entre_cepas_de_Aspgillus_flavus_productoras_y_no_productoras_de_aflatoxinas

SUAREZ, F. *Persistencia y capacidad infectiva del hongo fitopatógeno Fusarium oxysporum f.sp. melonis en residuos vegetales de melón.* (Tesis)(Doctoral) [En línea] Universidad de Almería, Almería, España. 2001. pp. 123-124 [Consulta: 25 de Noviembre de 2017.] Disponible en:

[https://books.google.com.ec/books?id=_aZMAQAAQBAJ&pg=PA123&lpg=PA123&dq=fusarium+crecimiento+en+caldo&source=bl&ots=0ZdbM120XH&sig=LHfNdY1GB9G58vqj08gsPOvkB4s&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjS7YiB5OTXAhUDZCYKHdl7DpcQ6AEIVTAJ#v=onepage&q=fusarium%20crecimiento%](https://books.google.com.ec/books?id=_aZMAQAAQBAJ&pg=PA123&lpg=PA123&dq=fusarium+crecimiento+en+caldo&source=bl&ots=0ZdbM120XH&sig=LHfNdY1GB9G58vqj08gsPOvkB4s&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjS7YiB5OTXAhUDZCYKHdl7DpcQ6AEIVTAJ#v=onepage&q=fusarium%20crecimiento%20)

TANGARIFE, V. *Penicillium spp.* [En línea] 2011. [Consulta: 20 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=100815>.

TANGARIFE, V. *Fusarium spp.* [En línea] 2016. [Consulta: 26 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=100813>.

THIRIBHUVANAMALA, G. *Panama Wilt: Fusarium oxysporum f.sp cubense.* [En línea] Crop protection: 2015. [Consulta: 26 de Noviembre de 2017.] Disponible en: http://agritech.tnau.ac.in/crop_protection/banana_diseases/crop_prot_crop%20diseases_fruits_banana_7.html.

TIRADO, D, et al. "Biotratamientos de aguas residuales en la industria láctea". *Producción + Limpia* [En línea], 2016, (Colombia) Vol. 11.(1), pp. 171-184. [Consulta: 17 de Noviembre de 2017.] ISSN 2323-0703. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/311502219_Biotratamientos_de_aguas_residuales_en_la_industria_lactea

TOPANTA, M. *Grasas y aceites*. [En línea] Escuela Politécnica del Litoral; 2009. [Consulta: 03 de Noviembre de 2016.] Disponible en: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/.../2/GRASASYACEITES.doc>.

TORMO, R. *Aspergillus flavus*. [En línea] Plantas y hongos: 2014a. [Consulta: 20 de Noviembre de 2017.] Disponible en: http://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Aspergillus_flavus.htm.

TORMO, R. *Penicillium digitatum*. [En línea] Plantas y hongos: 2014b. [Consulta: 25 de Noviembre de 2017.] Disponible en: http://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Penicillium_digitatum.htm.

ULACIO, D, et al. "Micobiota del suelo de zonas productoras de papa del estado mérida y su relación con rhizoctonia solani". *Bioagro* [En línea], 2002, (Venezuela) Vol. 14(1), pp. 11-16. [Consulta: 23 de Noviembre de 2017.] ISSN 1316-3361. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/857/85714102.pdf>

UNIVERSIDAD DE HUELVA (UHU). *Lípidos*. [En línea] 2005. [Consulta: 15 de Noviembre de 2017.] Disponible en: http://www.uhu.es/08007/documentos%20de%20texto/apuntes/2005/pdf/tema_03_lipidos.pdf.

UNIVERSIDAD DEL CÉSAR (UNICESAR). *Tratamiento biológico de trampas de grasa*. [En línea] 2009. [Consulta: 15 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://unicesar.ambientalex.info/infoCT/Trampagrasas.pdf>.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA IN DAVIS (UCDAVIS). *Aspergillus sp.* [En línea] Viticulture & Enology: 2014a. [Consulta: 18 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/aspergillus.html>.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA IN DAVIS (UCDAVIS). *Penicillium sp.* [En línea] Viticulture & Enology: 2014b. [Consulta: 20 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/penicillium.html>.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM). *Microorganismos de alteración o deterioro.* [En línea] 2012. [Consulta: 17 de Noviembre de 2017.] Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/4Alteracion_6541.pdf.

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL (UTN). *Grasas y aceites.* [En línea] 2016. [Consulta: 28 de octubre de 2016.] Disponible en: <http://www.frlp.utn.edu.ar/materias/qcasis/aceitesygrasas>.

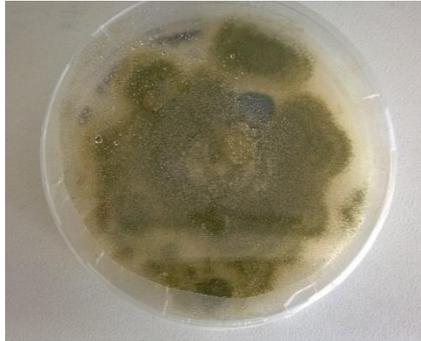
VILLANUEVA, R et al. "Control de bacterias patógenas y hongos de postcosecha con extractos del pigmento de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*)". *Agrociencia* [En línea], 2013, (México) Vol. 47(7), pp.691-705. [Consulta: 26 de Noviembre de 2016.] ISSN 1405-3195. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952013000700006

VILLENA, A. *Contaminación en la Industria Láctea.* [En línea] INSACAN: 2007. [Consulta: 28 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://www.insacan.org/racvao/anales/1995/articulos/08-1995-02.pdf>.

ZAMORA, A. *Grasas, Aceites, Ácidos grasos, Triglicéridos.* [En línea] 2016. [Consulta: 12 de Noviembre de 2017.] Disponible en: <http://www.scientificpsychic.com/fitness/aceites-grasas2.html>.

ANEXOS

ANEXO A. Recopilación fotográfica



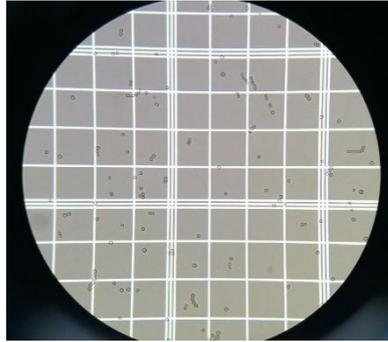
Fotografía 1A. *Aspergillus* spp en agar base Tributirina con mantequilla



Fotografía 2A. *Penicillium* spp en agar base Tributirina con mantequilla



Fotografía 3A. *Fusarium* spp en agar base Tributirina con mantequilla



Fotografía 4A. Conteo de esporas en cámara de Neubauer



Fotografía 5A. Muestreo del agua residual



Fotografía 6A. Canaleta de salida



Fotografía 7A. Inoculación del agua residual



Fotografía 8A. Unidades experimentales



Fotografía 9A. Análisis de aceites y grasas



Fotografía 10A. Extracción del solvente

ANEXO B. ANÁLISIS INICIALES



LABORATORIO DE SERVICIOS AMBIENTALES



N° SE: 226-17

INFORME DE ANALISIS

NOMBRE: Verónica Verdezoto **INFORME N°** 226- 17
EMPRESA: Proyecto de Tesis ESPOCH **N° SE:** 226-17
DIRECCIÓN: Cdla. José Lascano
FECHA DE RECEPCIÓN: 15 - 09 -17
TELÉFONO: 032374062 **FECHA DE INFORME:** 22 - 09- 17
NÚMERO DE MUESTRAS: 1, Agua residual industria láctea, Quimiag, Riobamba **TIPO DE MUESTRA:**
IDENTIFICACIÓN: MA - 369-17 Agua

El laboratorio se responsabiliza solo del análisis, no de las muestras.

RESULTADO DE ANÁLISIS

MA - 369-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* Aceites y grasas	mg/l	EPA 418.1	2746	N/A	15 - 09 -17
DQO	mg/l	STANDARD METHODS 5220 - D mod	34450	N/A	15 - 09 -17
* DBO5	mg O2/l	STANDARD METHODS 5210 - B	19598	N/A	15 - 09 -17
* Sólidos Suspendidos	mg/l	STANDARD METHODS 2540 - D	3900	N/A	15 - 09 -17
Sólidos Totales	mg/l	STANDARD METHODS 2540 - B	40674	N/A	15 - 09 -17
* Fosfatos	mg/l	STANDARD METHODS 4500 - P - E	485	N/A	15 - 09 -17
* Cloruros	mg/l	STANDARD METHODS 3500 - CI E	502	N/A	15 - 09 -17
* Coliformes Totales	NMP/100 ml	STANDARD METHODS 9221 - B	620	N/A	15 - 09 -17
* Coliformes Fecales	NMP/100 ml	STANDARD METHODS 9221 - B	< 2 (Ausencia)	N/A	15 - 09 -17
* Nitrito - N	mg/l	STANDARD METHODS 4500 - NO2 -	2,40	N/A	15 - 09 -17
* Nitrato - N	mg/l	STANDARD METHODS 4500 - NO3 - E	1390	N/A	15 - 09 -17

MÉTODOS UTILIZADOS: Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales APHA, AWWA, WPCF, STANDARD METHODS 21ª EDICIÓN y métodos HACH adaptados del STANDARD METHODS 21ª EDICIÓN.

RESPONSABLES DEL ANÁLISIS:

Dr. Juan Carlos Lara
Benito Mendoza T., Ph.D.

Dr. Juan Carlos Lara R
TECNICO L.S.A.

-Los resultados de este informe corresponden únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).
-Se prohíbe la reproducción parcial de este informe sin la autorización del laboratorio.

FMC2101-01

Página 1 de 1

L.S.A. Campus Máster Edison Riera Km 1 ½ vía a Guano Bloque Administrativo.

ANEXO C. ANÁLISIS FINALES DBO₅



LABORATORIO DE SERVICIOS AMBIENTALES



N° SE: 246-17

INFORME DE ANALISIS

NOMBRE: Verónica Verdezoto **INFORME N°** 246- 17
EMPRESA: Proyecto de Tesis ESPOCH **N° SE:** 246-17
DIRECCIÓN: Cdla. José Lascano
TELÉFONO: 032374062 **FECHA DE RECEPCIÓN:** 04 - 10 -17
NÚMERO DE MUESTRAS: 13, Agua residual industria láctea, **FECHA DE INFORME:** 11 - 10- 17
IDENTIFICACIÓN: Quimiag, Riobamba **TIPO DE MUESTRA:**

MA - 396-17	A1	Agua
MA - 397-17	A2	Agua
MA - 398-17	A3	Agua
MA - 399-17	F1	Agua
MA - 400-17	F2	Agua
MA - 401-17	F3	Agua
MA - 402-17	M1	Agua
MA - 403-17	M2	Agua
MA - 404-17	M3	Agua
MA - 405-17	P1	Agua
MA - 406-17	P2	Agua
MA - 407-17	P3	Agua
MA - 408-17	C1	Agua

El laboratorio se responsabiliza solo del análisis, no de las muestras.

RESULTADO DE ANÁLISIS

MA - 396-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* DBO ₅	mg O ₂ /l	STANDARD METHODS 5210 - B	13255	N/A	04 - 10 -17

MA - 397-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* DBO ₅	mg O ₂ /l	STANDARD METHODS 5210 - B	9863	N/A	04 - 10 -17

MA - 398-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* DBO ₅	mg O ₂ /l	STANDARD METHODS 5210 - B	5313	N/A	04 - 10 -17

-Los resultados de este informe corresponden únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).
 -Se prohíbe la reproducción parcial de este informe sin la autorización del laboratorio.

Página 1 de 3

L.S.A. Campus Máster Edison Riera Km 1 ½ vía a Guano Bloque Administrativo.





LABORATORIO DE SERVICIOS AMBIENTALES



N° SE: 246-17

MA - 399-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* DBO5	mg O2/l	STANDARD METHODS 5210 - B	12177	N/A	04 - 10 - 17

MA - 400-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* DBO5	mg O2/l	STANDARD METHODS 5210 - B	14596	N/A	04 - 10 - 17

MA - 401-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* DBO5	mg O2/l	STANDARD METHODS 5210 - B	11651	N/A	04 - 10 - 17

MA - 402-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* DBO5	mg O2/l	STANDARD METHODS 5210 - B	6785	N/A	04 - 10 - 17

MA - 403-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* DBO5	mg O2/l	STANDARD METHODS 5210 - B	8574	N/A	04 - 10 - 17

MA - 404-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* DBO5	mg O2/l	STANDARD METHODS 5210 - B	11256	N/A	04 - 10 - 17

MA - 405-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* DBO5	mg O2/l	STANDARD METHODS 5210 - B	12439	N/A	04 - 10 - 17

-Los resultados de este informe corresponden únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).
-Se prohíbe la reproducción parcial de este informe sin la autorización del laboratorio.

Página 2 de 3

L.S.A. Campus Máster Edison Riera Km 1 ½ vía a Guano Bloque Administrativo.





LABORATORIO DE SERVICIOS AMBIENTALES



N° SE: 246-17

MA - 406-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* DBO5	mg O2/l	STANDARD METHODS 5210 - B	2893	N/A	04 - 10 - 17

MA - 407-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* DBO5	mg O2/l	STANDARD METHODS 5210 - B	7600	N/A	04 - 10 - 17

MA - 408-17

PARÁMETROS	UNIDADES	MÉTODO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO	U(K=2)	FECHA DE ANÁLISIS
* DBO5	mg O2/l	STANDARD METHODS 5210 - B	6864	N/A	04 - 10 - 17

MÉTODOS UTILIZADOS: Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales APHA, AWWA, WPCF, STANDARD METHODS 21ª EDICIÓN y métodos HACH adaptados del STANDARD METHODS 21ª EDICIÓN.

RESPONSABLES DEL ANÁLISIS:

Dr. Juan Carlos Lara
Benito Mendoza T., Ph.D.


Dr. Juan Carlos Lara R.
TECNICO L.S.A.

-Los resultados de este informe corresponden únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).
-Se prohíbe la reproducción parcial de este informe sin la autorización del laboratorio.