

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES



**CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE PETRÓLEO POR
MICROORGANISMOS AISLADOS DE UNA REFINERIA**

Tesis

Para optar el título profesional de:

INGENIERO AMBIENTAL

PRESENTADO POR:

RANDY ORHIEL RAMOS ALVAREZ

2020



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María – Perú

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 001-2021-FRNR-UNAS

Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 17 de febrero de 2020, a horas 12:45 p.m. en la Sala de Conferencias de la Facultad de Recursos Naturales Renovables para calificar la Tesis titulada:

“CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE PETRÓLEO POR MICROORGANISMOS AISLADOS DE UNA REFINERÍA”

Presentado por la Bachiller: **RAMOS ALVAREZ, Randy Orhiel**, después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara **APROBADA** con el calificativo de **“BUENO”**

En consecuencia, el sustentante queda apto para optar el Título de **INGENIERO AMBIENTAL**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para el otorgamiento del Título correspondiente.

Tingo María, 07 de Enero de 2021

Ing. MSc VICTOR BETETA ALVARADO
PRESIDENTE

Mcbigo. LUIS ALBERTO SANCHEZ ROMERO
MIEMBRO

Ing. MSc. ABBY S. DACRUZ RODRIGUEZ
MIEMBRO



Dr. CESAR LOPEZ LOPEZ
ASESOR

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL



**CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE PETRÓLEO POR
MICROORGANISMOS AISLADOS DE UNA REFINERIA**

Autor : RANDY ORHIEL RAMOS ALVAREZ

Asesor : Dr. CESAR SAMUEL LÓPEZ LÓPEZ

Programa de investigación : Biorremediación y recuperación de
ambientes degradados

Línea de investigación : Ciencias y Tecnologías Ambientales

Eje temático de investigación : Remediación Microbiana

Lugar de Ejecución : Laboratorio de Microbiología FRNR UNAS
- Tingo María

Duración : Fecha de inicio : 24 de Junio del 2019
Fecha de término: 25 de Diciembre del 2019

Financiamiento : S/. 7,474.90

FDU : No

Propio : Si

Otros : No

2020

DEDICATORIA

A Dios por permitirme alcanzar mis objetivos, metas trazadas y haberme brindado salud, sabiduría y las fuerzas necesarias para ejecutar esta tesis.

A mis queridos padres ZENAIDA SOFIA ALVAREZ BALDEON y EFRAIN RAMOS INGA por su apoyo incondicional a través del tiempo, y por ser los pilares fundamentales en mi formación y motivación para lograr todo lo alcanzado.

A mi hermana ANAIS por el apoyo y la inspiración de poder realizar este trabajo, y a mis Familiares por el apoyo motivacional para el desarrollo de la presente tesis.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por las por brindarme salud y el conocimiento necesario para poder realizar mi presente investigación y poder superar ciertas limitaciones que he superado a través del tiempo.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA por formarme como un profesional al servicio de la sociedad a la cual velaré. A mis docentes de la escuela profesional de Ingeniería Ambiental, por orientarme e impartir sus saberes y experiencias durante mi formación.

A mis padres, hermana y familiares los cuales fueron de mucha fortaleza e inspiración en poder lograr esta presente investigación

Al Dr. MSc. Mtblgo. César Samuel López López por su gran apoyo en su asesoría y apoyo en la realización del presente trabajo de investigación, a los señores miembros del jurado calificador: MSc. Víctor Manuel Beteta Alvarado, Mtblgo MSc. Luis Alberto Sánchez Romero, y MSc. Abby Solange Cruz Rodriguez por sus sugerencias en el presente trabajo.

A los técnicos de los laboratorios el Ing. Richard Sías Rodríguez, Ing. Neira y la Sra. Glelia Rios; por apoyo en ejecutar la parte operativa y análisis en la presente tesis.

A mis amigos (Enrique, Jimmy, Luis Antonio, Julio Cesar, Damila, Jhajaira, Erika, Miriam, Kevin, José, Juan Carlos, Elvis, Aldo, Angelica, Brian B., y Christian R.) por su apoyo tanto su motivación y en el desarrollo de la presente tesis.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Antecedentes de derrame de petróleo	4
2.2. Biorremediación.....	5
2.2.1. Microorganismos biorremediadores	6
2.2.2. Factores que afectan la biodegradación.....	7
2.2.3. Composición química y densidad del contaminante.....	8
2.2.4. Condiciones de operación.....	11
2.2.5. Evaluación de la eficacia de los biotratamientos.....	14
2.3. Características del suelo.....	15
2.3.1. Propiedades físicas.....	15
2.3.2. Propiedades químicas.....	26
2.3.3. Propiedades microbiológicas.....	42
2.4. Biorreactores.....	44
2.4.1. Biorreactor de Air Lift.....	45
2.4.2. Componentes que afectan en proceso de operatividad en los biorreactores Air Lift.....	45
2.5. Calidad del suelo.....	48
2.5.1. Erosión de los suelos.....	50
2.6. Procesos en remediación.....	52

2.6.1. Procesos de remediación biológicas.....	52
III. MATERIALES Y METODOS.....	57
3.1. Zona de realización.....	57
3.1.1. Ubicación política.....	57
3.2. Factor climatológico y geográficos.....	58
3.2.1. Tiempo.....	58
3.2.2. Geología.....	59
3.2.3. Geomorfología.....	59
3.3. Metodología.....	59
3.3.1. Fase recolección de información.....	59
3.3.2. Fase de campo.....	60
3.3.3. Fase de gabinete.....	61
3.4. Unidad experimental.....	61
3.5. Determinación de las propiedades físicas, químicas y biológicas.....	62
3.5.1. Determinación de las propiedades físicas del suelo.....	62
3.5.2. Determinación de las propiedades químicas del suelo.....	64
3.5.3. Determinación de las propiedades biológicas del suelo.....	68
3.5.4. Aislamiento de bacterias del suelo contaminado con petróleo.....	70
3.5.5. Identificación de géneros microbianos en suelos contaminados con petróleo refinado.....	71
3.5.6. Selección de microorganismos degradadores del Petróleo refinado.....	77
3.5.7. Selección/elección de organismos para uso biotecnológico.....	78
3.6. Preparación de biorreactores air lift.....	80
3.6.1. Operación en los biorreactores.....	81

3.7. Diseño de investigación.....	82
3.7.1. Ajuste estadístico.....	85
IV. RESULTADOS.....	86
4.1. Determinación de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.....	86
4.1.1. Determinación de las propiedades físicas en el suelo.....	86
4.1.2. Determinación de las propiedades químicas en el suelo.....	89
4.1.3. Determinación de las propiedades biológicas en el suelo.....	91
4.2. Identificación de los géneros de las bacterias presentes en el suelo.....	94
4.2.1. Reconociendo de las bacterias.....	94
4.3. Selección y elección de las bacterias con capacidad degradativa del hidrocarburo en el suelo.....	95
4.3.1. Bacterias con capacidad degradativa del hidrocarburo a diferentes concentraciones del petróleo en la primera repetición.....	95
4.3.2. Bacterias con capacidad degradativa del hidrocarburo a diferentes concentraciones del petróleo en la segunda repetición.....	96
4.3.3. Bacterias con capacidad degradativa del hidrocarburo a diferentes concentraciones del petróleo en la tercera repetición.....	98
4.4. Determinación de la eficiencia de la biorremediación de un suelo contaminado con petróleo usando el biorreactor Air Lift.....	99
4.4.1. Determinación de la eficiencia del biorreactor Air Lift.....	99

4.4.2. Datos obtenidos de los biorreactores en operación y la correlación entre los parámetros medidos.....	102
4.4.3. Correlación de variables.....	104
4.5. Análisis estadístico.....	106
V. DISCUSIÓN.....	110
VI. CONCLUSIONES.....	116
VII. RECOMENDACIONES.....	117
VIII. ABSTRACT.....	118
IX. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	119
ANEXOS.....	135
ANEXO A. Análisis estadísticos.....	136
ANEXO B. Identificación de presencia y ausencia de los microorganismos en la primera repetición.....	141
ANEXO C. Selección de placas para la realización de pruebas bioquímicas.....	142
ANEXO D. Pruebas de diferenciaciones bioquímicas de las bacterias....	143
ANEXO E. Prueba del Modelo Aditivo Lineal.....	145
ANEXO F. Formula del Medio Mínimo de Sales de Davis.....	146

INDICE DE CUADRO

Cuadro	Página
1. Registro de microorganismos aislados en suelos contaminados	7
2. Parámetros que dependen de un sistema eficaz de biorremediación.....	14
3. Categorías de permeabilidad de los suelos.....	15
4. Métodos de medición de la conductividad hidráulica.....	17
5. Clases de las conductividades Hidráulicas.....	18
6. Clasificación de la cantidad de los moteados.....	20
7. Categorización del tamaño de los moteados.....	21
8. Categorización del contraste del moteado.....	21
9. Categorización entre la matriz y los moteados.....	22
10. Consistencia del suelo en seco.....	23
11. Firmeza de la masa del suelo húmedo o fresco.....	24
12. Clasificación de la adhesividad del suelo.....	25
13. Categorización de la flexibilidad o plasticidad de los suelos.....	26
14. Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo.....	31
15. Categorización de los suelos de sus cationes Intercambiables.....	38
16. Niveles de CICE en el suelo.....	39
17. Tabla con la interpretación de los análisis de suelos.....	40
18. Rangos del potasio según la textura del suelo.....	41
19. Rangos del nitrógeno total en el suelo.....	42
20. Relación microbiana y la efectividad biológica.....	44
21. Parámetros físicos y químicos para una biorremediación.....	53
22. Coordenada del muestreo del suelo en la refinería.....	60

23. Flujograma de procesos para el análisis del suelo contaminado.....	61
24. Variables y operación.....	84
25. Propiedades físicas del suelo.....	86
26. Propiedades químicas del suelo sin contaminar.....	89
27. Propiedades químicas del suelo contaminado.....	90
28. Concentración de microorganismos en bacterias en el suelo.....	91
29. Concentración de Actinomicetos en el suelo.....	93
30. Reconocimiento de bacterias para el primer muestreo.....	94
31. Bacterias identificadas con capacidad degradativa del hidrocarburo.....	95
32. Bacterias identificadas con capacidad degradativa del hidrocarburo.....	97
33. Bacterias identificadas con capacidad degradativa del hidrocarburo.....	98
34. Crecimiento bacteriano en los biorreactores a través del tiempo y su porcentaje de eficiencia bacteriana en la biorremediación del petróleo refinado en la primera repetición.....	100
35. Crecimiento bacteriano en los biorreactores a través del tiempo y su porcentaje de eficiencia bacteriana en la biorremediación del petróleo refinado en la segunda repetición.....	101
36. Crecimiento bacteriano en los biorreactores a través del tiempo y su porcentaje de eficiencia bacteriana en la biorremediación del petróleo refinado en la tercera repetición.....	101
37. Datos obtenidos de la primera repetición en los biorreactores en operación.....	102
38. Datos obtenidos de la segunda repetición en los biorreactores en operación.....	103
39. Datos obtenidos de la tercera repetición en los biorreactores en	

operación.....	104
40. Correlaciones entre variables medidas en los biorreactores en operación.....	105
41. Análisis de Varianza.....	106
42. Prueba de Tukey (HSD) con la variable dependiente de Biomasa Microbiana y la variable independiente de Petróleo.....	107
43. Correlación entre el Petróleo y la biomasa microbiana (M.O).....	109
44. Diseño de análisis de varianza (ANVA).....	137
45. Diseño de Tukey.....	137
46. Diseño de Correlaciones de Pearson.....	139
47. Escala de índice de correlación de Pearson.....	139
48. Rango de interpretaciones de los coeficientes de varianza.....	139
49. Reconocimiento de la presencia o ausencia de bacterias en seis diferentes medios de cultivos de la muestra del suelo.....	141
50. Selección de las placas conforme al crecimiento presentado para cada muestra.....	142
51. Reconocimiento de bacterias de la muestra del suelo en la primera repetición.....	143
52. Reconocimiento de bacterias de la muestra del suelo en la segunda repetición.....	143
53. Reconocimiento de bacterias de la muestra del suelo en la tercera repetición.....	144
54. Composición para 1L de medio mínimo de sales.....	146
55. Composición para 1L de la solución traza de elementos.....	146

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Trayecto metabólico de capacidad degradativa del petróleo.....	9
2. Trayecto de los agregados xenobióticos en el ecosistema.....	10
3. Recorrido de agregados xenobióticos en el medio.....	11
4. Permeámetro de carga variable.....	18
5. Tipos de productos de petróleo y TPH's, números de carbonos aproximados y los rangos de puntos de ebullición.....	27
6. Dispositivo de extracción Soxhlet.....	29
7. Período biogeoquímico del cadmio.....	34
8. Transmisión en el suelo con presencia del cadmio.....	34
9. Biorreactor en fase líquida.....	45
10. Integración de las propiedades físicos, químicos y biológicos en la calidad del suelo.....	48
11. Procedimientos y las propiedades en relación a la eficacia y su sustentabilidad en el suelo.....	49
12. Mapa de la zona de estudio.....	58
13. Cálculo del número de microorganismos por el método de diluciones seriadas.....	70
14. Instalación del biorreactor Air Lift.....	81
15. Diseño experimental.....	83
16. Concentraciones bacterianas en el suelo de la refinería.....	92
17. Concentraciones de Actinomicetos en el suelo de la refinería.....	93

18. Peso de la muestra.....	
19. Preparación de la muestra.....	147
20. Siembra del cultivo en el agar.....	148
21. Crecimiento en los medios de cultivos de la muestra de suelo.....	148
22. Conteo de microorganismos en el agar Plate Count.....	149
23. Observación del Bacillus sp. en el microscopio.....	149
24. Observación del Bacilos sp. en el microscopio.....	150
25. Prueba bioquímica de las bacterias encontradas.....	150
26. Crecimiento de las bacterias en el Agar Mínimo de Sales Minerales de Davis.....	151
27. Inicio del proceso de operaciones en los biorreactores.....	151
28. Mediciones del pH de los biorreactores.....	152
29. Mediciones del OD y °T de los biorreactores.....	152
30. Observación del biofilm en el biorreactor.....	153
31. Observación del crecimiento de microorganismos del biorreactor.....	153
32. Observación del crecimiento de microorganismos de los biorreactores en los agares para su selección.....	154
33. Prueba de determinación del hidrocarburo total de petróleo por el Soxhlet.....	154
34. Prueba de análisis del boro del suelo.....	155
35. Análisis para determinar la prueba de moteados y consistencia.....	155
36. Prueba de la permeabilidad y conductividad hidráulica del suelo.....	156
37. Prueba para la determinación del color del suelo en la tabla Munsell.....	156
38. Extractos de muestras de los biorreactores en operación del día 15.....	157

RESUMEN

Se estudió la capacidad de degradación de microorganismos aislados del suelo de una refinería para determinar su tasa de eficiencia al desarrollar en suelos contaminados con petróleo refinado. Se utilizaron muestras provenientes del suelo de una refinería de la ciudad de Pucallpa, Ucayali. Se aislaron e identificaron microorganismos presentes en la muestra. Se comprobaron las características físicas y químicas del suelo antes y después de ser contaminado con petróleo y en biorreactores air lift conteniendo concentraciones de 0.25 mL, 0.5 mL, 0.75 mL y 1.0 mL de petróleo refinado se inocularon los microorganismos previamente aislados e identificados encontrándose que la tasa de producción de biomasa es de alrededor del 13 %, bajo condiciones de desarrollo de pH entre 8.2 a 9.0, con O.D. de 0.77 a 3.57 y temperatura entre 27.6 a 30.8 °C, la tasa de eficiencia de degradación (determinada por el desarrollo microbiano) aparentemente es baja en términos de degradación, pero permite a los microorganismos mantenerse viables en los suelos de la refinería a condiciones extremas, estos microorganismos podrían ser procesados adecuadamente con técnicas de modificación genéticas para incrementar su tasa de eficiencia de degradación del petróleo. Los microorganismos identificados pertenecen a los géneros *Enterobacter* y *Serratia* y bacterias del grupo de los Actinomicetos.

Palabras clave: Petróleo, degradación, biorreactores Air Lift.

I. INTRODUCCIÓN

La biorremediación es la capacidad de los organismos de multiplicarse gracias a un medio favorable (SHMAEFSKY, 1999, MACK KAY, 2001). Unos cuantos tienen la capacidad de degradar compuestos de CO₂, agua, minerales etc. Así generan subproductos que son de poco impacto al ecosistema (ADVANCED BIOTECH, 2019). Esta habilidad permite tratar los agentes alteradores ocasionando un impacto progresivo, en comparación de otras operaciones de purificación (MOLNAA y GRUBBS, 2001).

La técnica de remediación es aplicada también in situ o ex situ. Las técnicas in situ son las que se tratan en la zona contaminada a remediar, a diferencia de la técnica ex situ son tratados en un lugar donde puede ser manipulado externamente a la zona contaminada. (GRUIZ y KRISTON, 1995; SHMAEFSKY, 1999; TUTTLE y LESTER, 2001).

La remediación se divide en procesos de crecimiento y abundancia de microorganismos. Los procesos de crecimiento contemplan la manipulación de insumos nutritivos para generar un crecimiento microbiano y el desarrollo de los microorganismos idóneos de descomponer cuerpos contaminados en el ambiente (BAHERI y MEYSAMI, 2002; GRUIZ y KRISTON, 1995).

El bioaumentación describe la inducción de microorganismos a un determinado objeto o material con una intención de prescindir compuestos no deseables (SHMAEFSKY, 1999). También los microorganismos específicos son capaces de biodegradar contaminantes no admitidos hasta sus moléculas (ADVANCED BIOTECH, 2019).

Los microorganismos que residen en diversos ambientes sean terrestres y/o acuáticos, según el clima y región geográfica son varios y capaces de utilizar cualquier compuesto orgánico que se encuentre en su contorno. Por lo tanto, estos microorganismos tienen la capacidad de usar el petróleo refinado, como fuente de energía y carbono (MADIGAN *et al.*, 1998).

La capacidad de resiliencia de los suelos es limitada, se reprime con la incorporación de residuos, ya sea por las altas concentraciones que retrasan su biodegradación por su condición de residuos (POZZO, 1996).

En efecto el problema planteado de este trabajo radica en torno a la siguiente interrogante: ¿Cuál es la capacidad biodegradadora del petróleo por los microorganismos aislados de una refinería?

Con relación al problema planteado, se formula la siguiente hipótesis: concierne que; la capacidad biodegradadora del petróleo por los microorganismos aislados de una refinería es baja.

1.1. **Objetivos:**

Objetivo General:

- Determinar la capacidad biodegradadora de petróleo por microorganismos aislados de una refinería.

Objetivos Específicos:

- Determinar las propiedades físicas, químicas y biológicas de un suelo contaminado con petróleo de una refinería
- Aislar e identificar los géneros de las bacterias presentes en un suelo contaminado con petróleo.
- Seleccionar y elegir las bacterias con capacidad degradadora del petróleo.
- Determinar la eficiencia de los microorganismos aislados de un suelo de una refinería para degradar petróleo usando biorreactor Air Lift.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes de derrame de petróleo

En el 2001, sucedió un derrame de petróleo en el Puerto Eten, también sucedió un 2do accidente de derrame que ocasionó daños a las playas del mismo puerto. En el 2002 sucedió un accidente de derrame de petróleo en Paiñas al norte de Talara. En el 2006 se derramó petróleo diésel, ocasionado por un buque en el Callao. En el 2007 sucedió un derrame en la provincia de Bagua donde se vertieron 100 barriles de petróleo. En el 2009, el oleoducto norperuano que transportaba petróleo hasta la refinería de Pucallpa ocurrió un derrame de petróleo, generando una alteración ambiental a seis kilómetros de la ciudad de Pucallpa (ENERGÍASUR, 2019).

Aunque se sabe que los microorganismos degradan los diversos ingredientes presentes en el petróleo refinado, existe la necesidad de aislar nuevos microbios que no solo pueden degradar los componentes principales del aceite, sino que también pueden agotar selectivamente otros compuestos. La mayoría de petróleos son degradables después de su eliminación (HEINONSALO *et al.*, 2000), sin embargo, hay muy poca información disponible sobre la Transformación química de dichos compuestos en condiciones ambientales naturales. El objetivo de la presente investigación será del

aislamiento de los microorganismos degradadoras del petróleo refinado y la evaluación de su eficiencia degradativa del petróleo en el suelo.

2.2. Biorremediación

La biorremediación, constituye una biodegradación de sustancias orgánicas, sustancias que operan como carbono forzoso para su incremento celular y fuente de energía que necesitan estos microorganismos para su reproducción.

Según la Normativa IRAM 29555-1:2003, para diseñar un procedimiento de remediación de estos procedimientos metabólicos, se necesita que el ambiente brinde circunstancias mecánicas, sintéticas y orgánicas favorables tales a conocer lo siguiente:

- Es necesario resguardar la subsistencia de bacterias autóctonas con capacidad de usar el petróleo como nicho de carbono y energía.
- Es obligatorio que exista en el sistema unos receptores de aniones que se oxiden las fuentes de carbonos que son componentes del petróleo.
- Verificar los escenarios óptimos de los parámetros físicos, químicos y biológicos estén en una condición estable.

Durante un proceso degradativo se transforma arbitrariamente o en general los agentes contaminadores naturales. En la evolución arbitraria se produce un agregado con menor toxicidad. En una mutación se produce un resultado final de CO₂ y H₂O en procedimientos con presencia del aire como también en procedimientos sin presencia de oxígeno (BASCO PLA y CASTILLO, 2014).

2.2.1. Microorganismos biorremediadores

Estas bacterias, se encuentran en el ecosistema, tienen el contenido de diferentes compuestos tóxicos, sin embargo, su densidad poblacional es limitada en sitios no contaminados y se incrementa en ambientes impactados por un contaminante (NÚÑEZ, 2003; MADIGAN *et al.*, 2004).

En el siguiente cuadro 1, se reportan los microorganismos aislados de suelo alterado con petróleo localizados que se encuentra en una cuenca, en el noroeste de la provincia de Río Negro (ALTAMIRANO y POZZO ARDIZZI, 2000).

Cuadro 1. Registro de microorganismos aislados en suelos contaminados

Género	Especie	Fuente
	<i>roseus</i>	Tierra alterada
	<i>sedentarius</i>	Tierra alterada
<i>Micrococcus</i>	<i>varians</i>	Tierra alterada
	<i>spp.</i>	Tierra alterada
<i>Sphingomonas</i>	<i>paucimobilis</i>	Tierra alterada
<i>Pseudomonas</i>	<i>vescicularis</i>	Rizósfera

Fuente: ALTAMIRANO y POZZO ARDIZZI, 2000

También se destacan hongos con capacidad hidrocarbúrlítica pertenecientes a los géneros: *Acrostalagmus*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Fusarium* y *Cephalothecium*. (POZZO ARDIZZI *et al.*, 1999).

2.2.2. Factores que afectan la biodegradación

Un sistema de biorremediación eficiente obedece a la celeridad de descomposición de suelos, por ello se debe tomar en cuenta los componentes abióticos y bióticos.

La humedad, temperatura y pH

Un microorganismo tiene un aguante a ciertos aspectos ambientales, las cuales son: pH, temperatura y salinidad, donde el efecto es al

aumento y la actividad microbiana. En la actualidad no existen parámetros pre-establecidos para una degradación adecuada tales como rangos de temperatura 20-30 °C y el pH entre 6-8 (ALEXANDER, 1961).

La diferenciación de los rangos de pH del suelo suele dañar el aumento microbiano como también los contaminantes e iones. El rango pH adecuado para el desarrollo de la degradación es neutro (7,4 - 7,8). El factor de humedad del suelo ocasiona de forma drástica el proceso de degradación de los contaminantes en el suelo (VERSTRAETE *et al.*, 1976).

2.2.3. Composición química y densidad del contaminante

Según (ERCOLI *et al.*, 2000), la degradación de un combinado orgánico depende de la capacidad de los microorganismos para usarlo como fuente de carbono, en el lugar de efecto del catalizador degradativa esta estrechado, el efecto no se ejecutará, ocasionando una disminución del efecto degradativo.

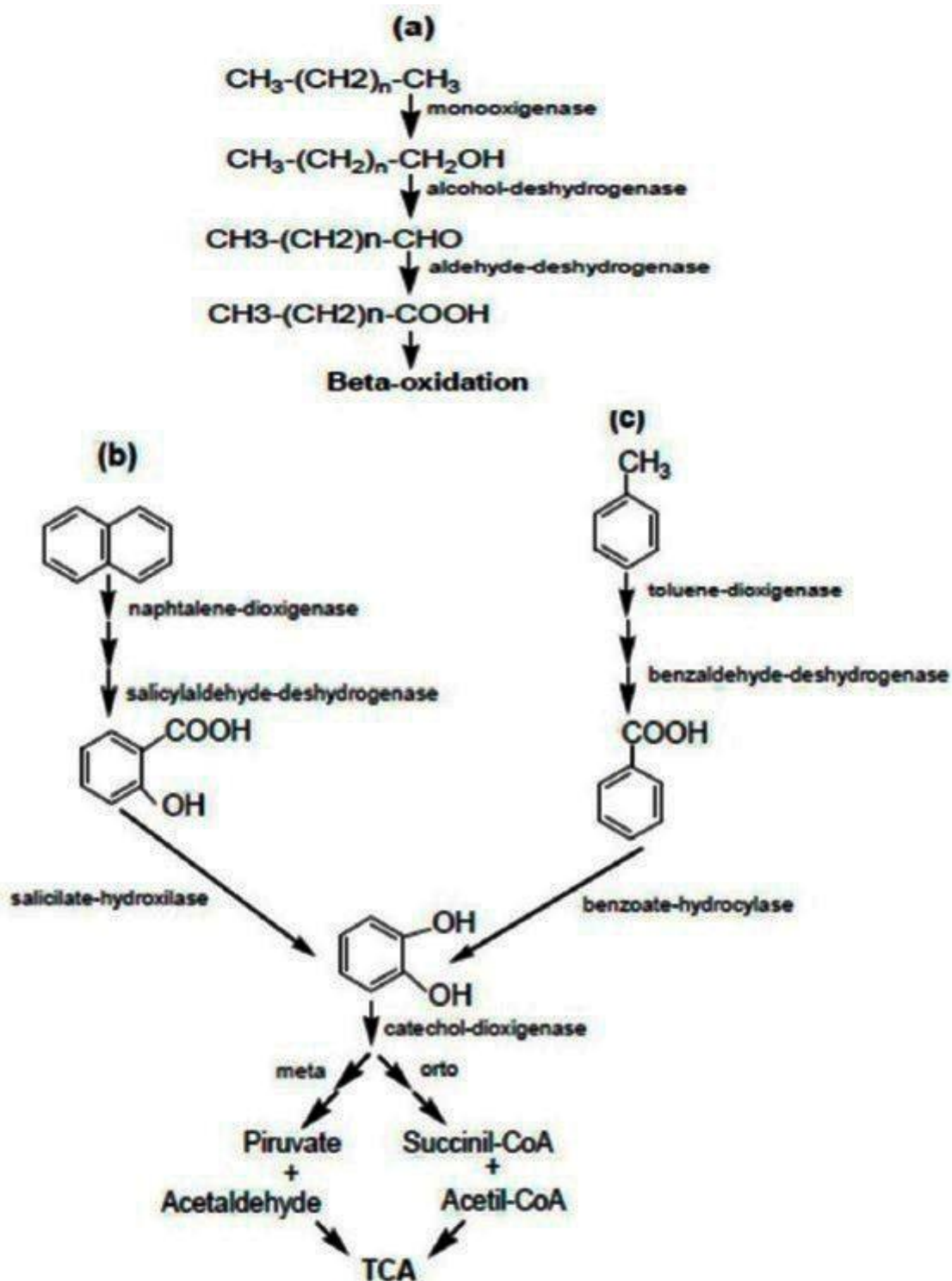


Figura 1. Trayecto metabólico de capacidad degradativa del petróleo (NÁPOLES

ÁLVAREZ, J. y ÁBALOS RODRÍGUEZ, A. 2008).

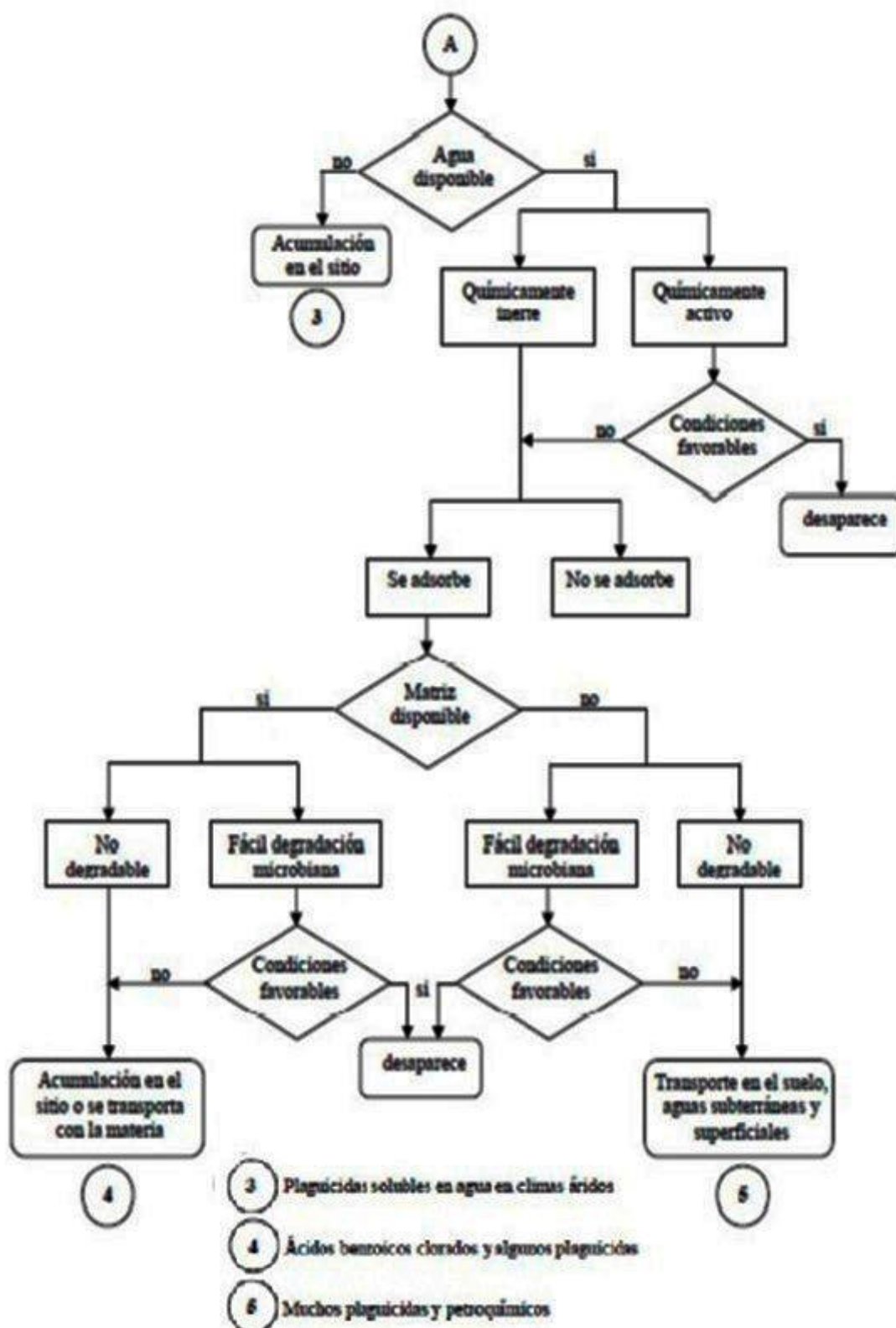


Figura 2. Trayecto de los agregados xenobióticos en el ecosistema (NÁPOLES
 ÁLVAREZ y ÁBALOS RODRÍGUEZ, 2008)

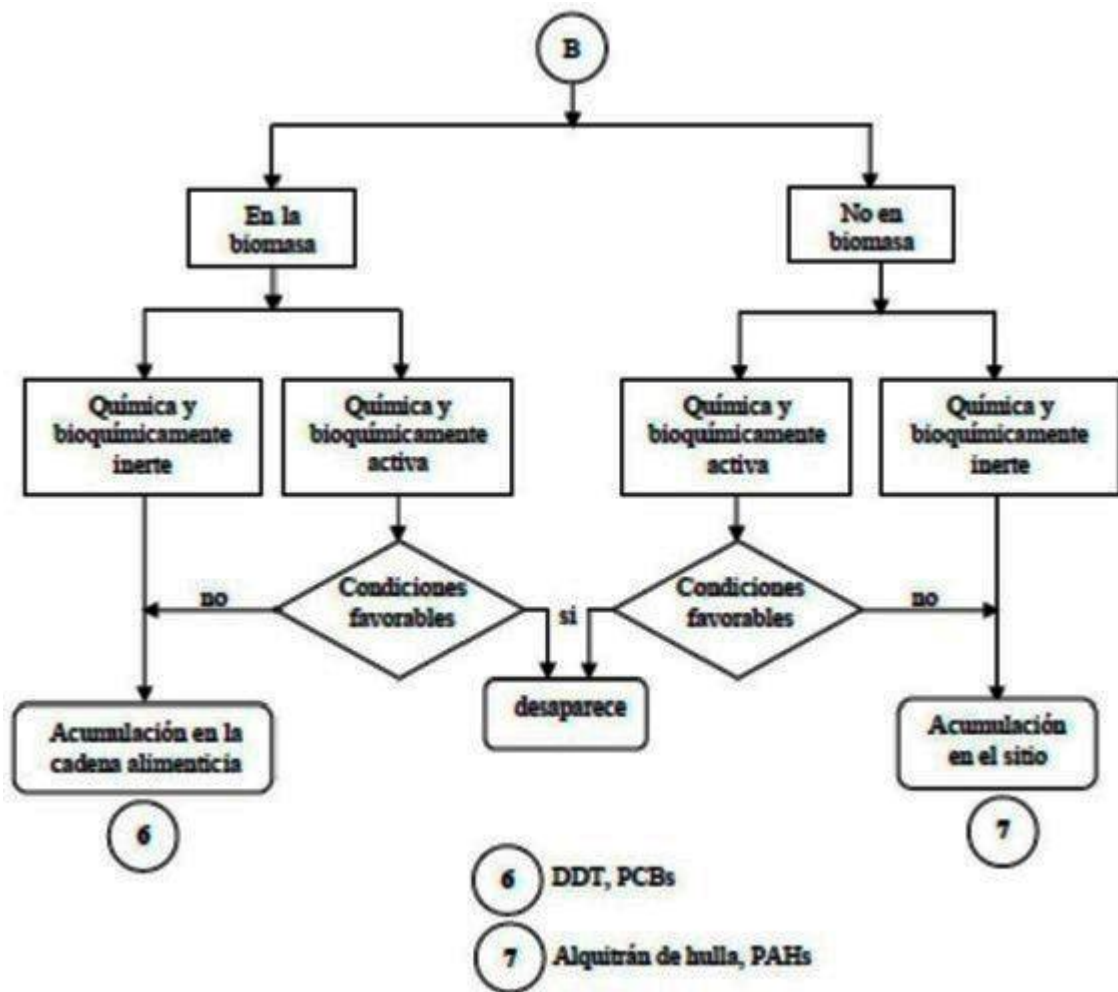


Figura 3. Recorrido de agregados xenobióticos en el medio (NÁPOLES
 ÁLVAREZ, J. y ÁBALOS RODRÍGUEZ, A. 2008)

2.2.4. Condiciones de operación

A. pH

El pH del sistema suelo-contaminante-microorganismos más adecuado corresponde a 6 y 8 de rango y el pH neutro se considera óptimo.

B. Humedad

La humedad puede condicionar de forma severa la biodegradación, el exceso de humedad genera procesos anaeróbicos, la escases retarda el proceso por disminución de actividad y muerte de las células microbianas. Es provechoso conservar una humedad cerca del 60 % de su cabida portante del campo.

C. Temperatura

Esta influye en la aceleración biodegradativa de las bacterias. Los rangos óptimos oscilan de 15 °C a 45 °C, ciertas investigaciones de biodegradación se hicieron con bacterias termófilos excesivos y criófilos (FEITKENHAUER *et al.*, 2003).

D. Celeridad de degradación

Esta se incrementa con la temperatura, pero no debe pasar los 40 °C, ocasiona una desvalorización del crecimiento bacteriano por la disolución enzimática y se genera una elección bacteriana de especies tenaces a temperaturas extremas (SEMPLE *et al.*, 2001).

E. Disponibilidad del oxígeno

En una biodegradación ocurren fuerzas de óxidos y reductores para la generación de energía. El vínculo comienza con la sustancia orgánica, exterior a la célula, que ejerce como librador de aniones. Los receptores de los aniones usados por las bacterias son “el oxígeno, ion nitrato, hierro (III), ion sulfato y el dióxido de carbono (MADIGAN *et al.*, 2004).

F. Concentración de nutrientes

El metabolismo microbiano requiere de fuentes de macronutrientes: carbono, nitrógeno, fósforo y potasio. Las bacterias son idóneas para ser empleados desde formas oxidativas (CO_2) incluso compuestos de polímeros de mayor balance molecular, incluidos compuestos tóxicos. Los compuestos orgánicos se añaden átomos de carbono a la estructura de las células, la cual son una fuente de combustible metabólico, algunos organismos tienen generan su fuente de energía como también otros buscan su fuente energética para subsistir (MADIGAN *et al.*, 2004).

G. Cantidad microbiana

La cantidad de microorganismos es el elemento condicionante para que exista la bio-descomposición. Se requiere la existencia de una cantidad de microorganismos amoldada al medio, donde se tenga enzimas con la finalidad de degradar las reacciones.

Este tratado puede realizarse mediante tres mecanismos:

- Inducción de enzimas específicas,
- Permutas genéticas que mutan en diversas manifestaciones del metabolismo, o
- Florecimiento específico para organismos idóneos a fin de convertir un compuesto a estudiar.

2.2.5. Evaluación de la eficacia de los biotratamientos

La eficacia de un sistema de biorremediación depende de los parámetros que se agrupan en tres categorías.

Cuadro 2. Parámetros que dependen de un sistema eficaz de biorremediación

Parámetros de control para evaluar la eficiencia de un biotratamiento		
Tipos de parámetros de los suelos	Tipos de parámetros sintéticos	Situaciones climatológicas
Densidad de la población bacteriana		
pH del suelo		Temperatura ambiente
Saturación de los suelos	Volatilidad	Precipitaciones
Clima de los suelos	Estructura química	Vientos
Concentraciones de los nutrientes	Concentración Toxicidad	Humedad relativa
Textura de los suelos		

Fuente: BELTRÁN *et al.*, 2018

Operativamente, se deben identificar los parámetros que se apartan de los intervalos eficaces que se proporcionan y se debe comprobar que el equipo diseñado y sus descripciones brinden operatividad al equipo y compensen cualquier condición de sitio no adecuada.

2.3. Características del suelo

2.3.1. Propiedades físicas:

A) Permeabilidad

Según GUERRERO (2013), es la intensidad de infiltración en el suelo, gracias a la porosidad del suelo, la cual hace el desplazamiento del agua en su interior. La cual se analizará la permeabilidad por el procedimiento del permeámetro de carga variable o continua.

En el cuadro 3, se observa las categorías de permeabilidad.

Cuadro 3. Categorías de permeabilidad de los suelos

Categoría de permeabilidad	Rango de permeabilidad		Ejemplos de suelos
	(cm/hora)	(cm/día)	
Muy Pausada	< 0.13	< 3.00	Arcilla, clay pan, masivo
Pausada	0.13 - 0.60	3 - 12	Arcilla, masivo, limoso
Prudentemente lenta	0.60 - 2.00	12 - 48	Francos arcillos limoso
Prudentemente	2.00 - 6.30	48 - 151	Francos limosos, francos
Prudentemente alígera	0.63 - 12.7	151 - 305	Francos arenosos
Rápida	12.7 - 25	305 - 600	Arenas francas, suelto sin estructuras
Muy rápida	> 25	> 600	Arenas francas gruesas, arenas sueltas, granos simples

Fuente: GUERRERO, 2013

B) Conductividad hidráulica

Es un parámetro de medición de poros del suelo para ver la

permeabilidad, la porosidad y la saturación en el suelo. Ya que ello involucra una diferenciación entre la Permeabilidad Intrínseca y la Conductividad (DONADO, 2004).

Procedimiento para determinar la conductividad hidráulica

El parámetro de conductividad hidráulica es importante para la simulación de flujos de aguas subterráneas como para determinar la infiltración en el suelo. También se puede calcular la conductividad hidráulica con otros parámetros de medición, pero hay la probabilidad de que la estimación sea errónea gracias a las interrelaciones acuoso-sólido (DONADO, 2004)

A continuación, en el Cuadro 4 (YOUNGS, 2001) se observa los siguientes métodos.

Cuadro 4. Métodos de medición de la conductividad hidráulica

CLASE DE METODO	METODO	EQUIPO	COMENTARIO
Procedimiento en el laboratorio con suelos impregnados de agua	1. Permeámetro de carga constante	ES	Se usan pequeños núcleos y columnas de suelo.
	2. Permeámetro de carga variable	ES	Se usan pequeños núcleos y columnas de suelo.
	3. Permeámetro oscilante	AE	Se usan pequeños núcleos y columnas de suelo. Solo es necesario agregar una pequeña cantidad de agua.
Procedimiento en el laboratorio con suelos en parte impregnados de agua	1. Método de infiltración	ES	Se usan columnas largas de suelo uniformes de suelo uniforme
	2. Permeámetro de momento variable	AE	Se usan columnas largas de suelo de suelo uniforme
Procedimiento de campo con nivel freático	1. Hoyo con barrena	ES	Ejemplares de suelo bajo el nivel freático.
	2. Piezométrico	ES	Ejemplares de suelo en la vecindad de la base abierta.
	3. Dos pozos	ES	Ejemplares de suelos entre las dos perforaciones.
	4. Bombeo de pozos	EPP	Usadas en pruebas de acuíferos a profundidad.
	5. Drenaje de tierra	ES	Ejemplares de suelos entre las surcos de derrame.
Procedimiento de campo sin nivel freático	1. Permeámetro de hoyo perforado	ES	Muestra de los suelos del espacio fresco.
	2. Inverso del hoyo con barrena	ES	Muestra de los suelos del espacio fresco.
	3. Permeámetro con entrada de aire	AE	Muestras de suelo dentro del tubo aislado.
	4. Infiltrómetro de disco	ES	Ejemplares de suelo próximo a la zona superficial.
	5. Goteo	ES	Ejemplares de suelo próximo a la zona superficial.
	6. Sorptividad	AE	Ejemplares de pequeño volumen (también puede clasificarse como un método de laboratorio con suelos parciales Usado en muestras de baja permeabilidad (también puede clasificarse como un método de campo con nivel freático)
	7. Infiltrómetro de presión	AE	
	8. Infiltrómetro de doble anillo	ES	Muestras de suelo cercanas a la superficie.

Fuente: YOUNGS, 2001

Cuadro 5. Clases de las conductividades Hidráulicas

CLASIFICACIÓN	CONDUCTIVIDADES HIDRÁULICAS	
	cm/h	m/día
Desmesuradamente tardía	0.10	0.03
Tardía	0.1 al 0.5	0.03 al 0.12
Prudentemente pausada	0.5 al 2.0	0.12 al 0.50
Ponderada	2.0 al 6.0	0.50 al 1.50
Prudentemente aligerada	6.0 al 12.0	1.50 al 3.00
Aligerada	12.0 al 18.0	3.00 al 4.50
Extremadamente Aligerada	> 18	> 4.50

Fuente: SERVICE E.U.A. SOIL CONSERVATION, (2008)

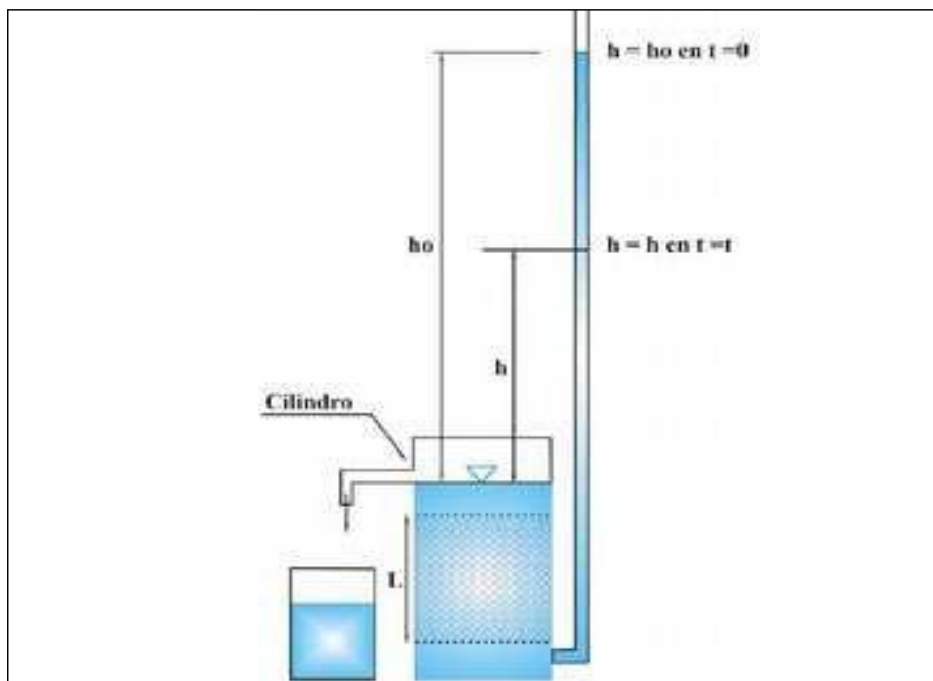


Figura 4. Permeámetro de carga variable (BOWLES, 1980)

C) Color

Según Munsell (1975), la coloración indica la constitución del suelo, como también las condiciones tales como la oxidación y reducción del suelo. Su constitución está hecha por polvos finos de material orgánico húmedo (opaco), óxidos de manganeso (pardos), óxidos de manganeso (negros) y óxidos de hierro (amarillos, pardos, naranja y rojos) como también pueda ser por la roca parental.

Según Munsell (1975), las cromas y los valores están visibles para un análisis, no es recomendable el uso de formas redondas, los apuntes deben estar precisas en el uso de los valores intermedios o su adición en un + o -.

Las letras minúsculas se usan como sufijos, para calificar a los horizontes principales especificando el carácter dominante de este horizonte. Las letras minúsculas van inmediatamente después de las letras mayúsculas. Las más frecuentes son:

- “t” acumulación de arcilla iluvial, (de textura, o sea granulometría).
B_t.
- “w” horizonte B de alteración, (de weathering = meteorización) reflejada, con respecto al horizonte inferior, por: la arcilla (alto contenido, formada in situ), y/o el color (más rojo o más pardo), y/o la estructura (edáfica, no la de las rocas originales). B_w.
- “g” moteado (abigarrado) por oxidación/reducción del Fe. Manchas de colores pardos/rojos y gris/verde. Hidromorfía parcial. B_g C_g y más raramente A_g (EDAFOLOGÍA, 2020)

D) Moteados

Según Munsell (1975), son imperfecciones de diversos colores con un color predominante al suelo. Dicha coloración indica que el suelo fue alterado como humedecido (reducido) y deshidratación (oxidado).

Color de moteados

Según Munsell (1975), la determinación de los colores de los moteados se realiza apreciando la tabla de Munsell.

Cantidad de moteados

Según MUNSELL (1975), la cantidad moteados se expresa en el porcentaje del total de la extensión de los moteados ocupados (véase Cuadro 6). Cuando la cantidad de moteados no permite apreciar una matriz o el color de esta, los colores resaltantes se deberán analizar y grabarse para los colores de la matriz en el suelo.

Cuadro 6. Clasificación de la cantidad de los moteados

Códigos	Cantidad de moteados	%
N	Ninguna	0
V	Demasiado poco	0 al 2
F	Escasos	2 al 5
C	Habitual	5 al 15
M	Demasiados	15 al 40
A	Demasiado Cuantioso	Mayores a 40

Fuente: FAO, 2009

Dimensión de moteados

El Cuadro 7, se observa las categorías de los tamaños de moteados.

Cuadro 7. Categorización del tamaño de los moteados

Códigos	Categorización de los tamaños de moteados	mm
MF	Demasiado suave	Menores a 2
FN	Suave	2 al 6
MD	Moderado	6 al 20
GR	Demasiado resistente	Mayores a 20

Fuente: FAO, 2009

Divergencia de moteados

La divergencia de los colores entre moteados y su matriz, se observa en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Categorización del contraste del moteado

Códigos	Categorización de la divergencia del moteado	Descripción
F	Frágil	Los moteados son indiscutibles cuando son observados a simple vista. La relación entre los colores y la matriz del suelo son gracias a los valores, las matrices y las cromas.
D	Desigual	Los moteados son observados con facilidad. Tanto la matriz, el valor y el cromas son reconocibles a simple vista. La cual pueden diferenciarse por más de 2.5 componentes de la matriz, el valor o el cromas.
P	Preponderante	El reconocimiento de los moteados es por ser claros y por ser el más relevante del horizonte. El valor, el cromas y la matriz son distinguibles y variables entre ellas.

Fuente: FAO, 2009

Demarcaciones de los moteados

Según Munsell (1975), la remarcación del grosor en el espacio, del color de la transición puede ubicarse sin necesidad de buscar la matriz del suelo (Véase Cuadro 9).

Cuadro 9. Categorización entre la matriz y los moteados

Códigos	Categorización entre la matriz y los moteados	mm
S	Sutil	< 0.5
C	Calmoso	0.5 _ 2
D	Dudoso	> 2

Fuente: FAO, 2009

E) Firmeza

Según la FAO (2019), hace referencia a la cohesión del suelo, dependerá mucho del conjunto y tipo de las arcillas, la humedad y el material orgánico. En muchas situaciones, la saturación de la firmeza o consistencia siempre se ha podido detallar, como en situaciones de humedad cuando está seco el suelo, y ocurre ello en la añadidura de agua al suelo.

A continuación, véase el Cuadro 10 donde se observa la firmeza del suelo en seco.

Cuadro 10. Consistencia del suelo en seco

Códigos	Consistencia del suelo	Descripción
DP	Desprendido	No coherente.
BL	Blando	La abundancia del suelo es muy débil en consistencia y rompible; se vuelve polvo o gránulos en poca presión.
LT	Levemente tieso	Poca resistencia a una coacción; la cual se deshace fácil en las manos.
TA	Tieso	Prudentemente duro a la presión; se deshace fácil en la palma de las manos; a la vez no ocurre esto en los dedos.
MT	Muy Tieso	Grandemente firme a la presión; se deshace fácil entre manos con un poco de dificultad.
ET	Enormemente Tieso	Extremada resistencia a la presión; no se deshace fácil entre las manos.

Fuente: FAO, 2009

Firmeza en un suelo fresco o húmedo

A continuación, véase el Cuadro 11 donde se observa la firmeza del suelo en húmedo.

Cuadro 11. Firmeza de la masa del suelo húmedo o fresco

Códigos	Firmeza del suelo fresco	Descripción
DS	Desprendido	Sin relación.
MD	Demasiado Disgregable	El material de suelo se aplasta bajo presión leve, pero es coherente cuando se lo presiona todo al mismo tiempo.
DG	Disgregable	El material de suelo se aplasta fácilmente bajo presión suave a moderada entre los dedos, y se vuelve coherente cuando se lo presiona junto.
EB	Estable	El material de suelo se aplasta bajo presiones moderadas entre los dedos, pero su resistencia es distintamente evidente.
ME	Muy Estable	El material de suelo se aplasta a presiones fuertes; apenas aplastable entre los dedos.
EET	Enormemente Estable	El material de suelo se aplasta solo a presiones muy fuertes; no puede aplastarse entre los dedos.

Fuente: FAO, 2009

Firmeza en suelos húmedos: mucha adhesividad y plasticidad

Según la FAO (2009), el suelo depende de su adhesividad en proporción a su disposición del suelo es disruptiva en presencia del agua. Para poder determinarlo se debe analizar en ciertas situaciones estándares en porciones del suelo, cuya disposición está en su totalidad destruida. También se determina la máxima adhesividad y se ve su viabilidad haciendo comparaciones entre otros tipos de suelos (Véase Cuadro 12).

Según la FAO (2009), es la destreza del suelo para poder cambiar de forma perpetua bajo influencia de cierta presión y contener dicha forma a pesar de cierta presión. Se analiza realizando un enrollamiento al suelo en los dedos de la mano, hasta crear un cordón de 3 mm de diámetro. (Véase Cuadro 13).

Cuadro 12. Clasificación de la adhesividad del suelo

Códigos	Clasificación de la adhesividad del suelo	Descripción
NF	No es fijado	Luego de infringir presión al suelo, tampoco se une a la mano.
SST	Ligeramente adherente	Luego de infringir presión al suelo, tampoco se une a la mano, como también no se despega posteriormente. No se dilata perceptiblemente cuando se alejan de los dedos.
FJ	Fijado	Luego de infringir presión al suelo, tampoco se une a la mano y se extiende al dilatarse al momento de apartarse de la mano.
EFJ	Exageradamente fijado	Al momento de infringir coacción al suelo, se une a la mano, también es evidentemente extensivo, y a la vez se apartan de la mano.

Fuente: FAO, 2009

Cuadro 13. Categorización de la flexibilidad o plasticidad de los suelos

Códigos	Categorización de la flexibilidad de los suelos	Descripción
NFL	No es flexible	No se perfila una tira del suelo.
LFL	Levemente flexible	Se perfila una tira del suelo, luego se destroza al momento si se realiza de una forma de un aro; el suelo se desfigura con una ligera presión.
PL	Flexible	Se perfila una tira del suelo, luego se destroza al momento si se realiza de una forma de un aro; el suelo se desfigura con una ligera a templada presión.
DFL	Demasiado flexible	Se perfila una tira del suelo, luego se destroza al momento si se realiza de una forma de un aro; el suelo se desfigura con una templada a mucha presión.

Fuente: FAO, 2009

2.3.2. Propiedades químicas

A) Hidrocarburos totales

Según TPHCWGS (1998), el 90 % de la composición del petróleo es difusa de los hidrocarburos, gracias a que son tratadas en refinerías, la cual son destilados y se obtienen una diversidad de subproductos para diferentes aplicaciones.

Según ATSDR (2019), la diversidad de productos sintéticos es la conformación de los hidrocarburos en sus derivados, de ello es sencillo aplicar una determinación de hidrocarburos totales que ver por cada compuesto por separado.

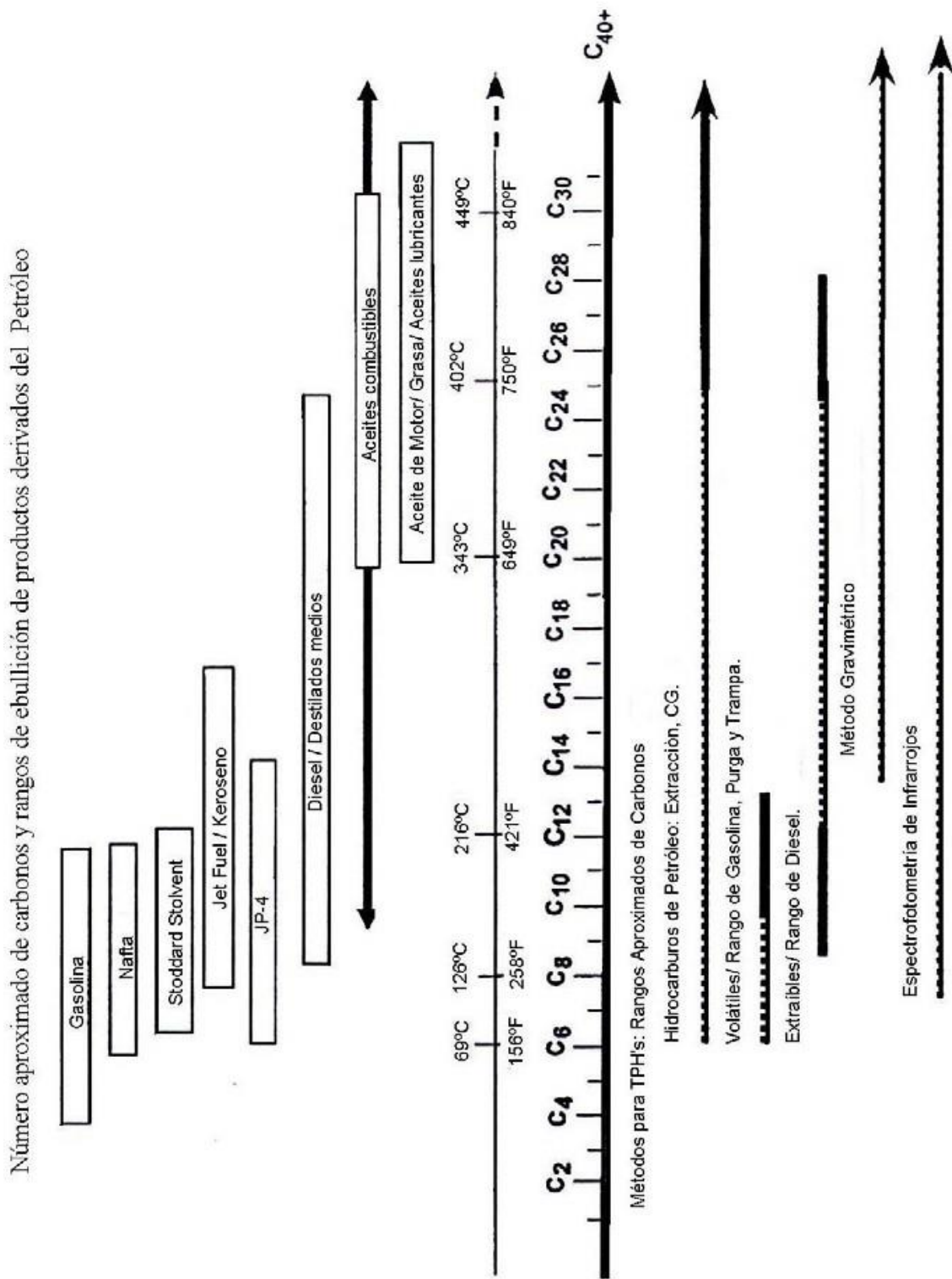


Figura 5. Tipos de productos de petróleo y TPH's, números de carbonos aproximados y los rangos de puntos de ebullición (TPHCWGS,1998)

Efectos sobre las propiedades físico químicas

Según (MARTÍNEZ & LÓPEZ, 2001), los derrames de hidrocarburos generan daños a las propiedades mecánicas (densidad real, densidad aparente, textura y porosidad) y sintéticas (pH, materia orgánica y conductividad eléctrica) sean entre relevantes y no significativas.

Efectos en el ser humano

Una vez que ha ocurrido un derrame, existen diferentes vías de exposición a estos contaminantes, entre ellas se pueden mencionar:

- Contacto dérmico con el suelo contaminado: Afecta al ciclo de nutrientes, invertebrados y plantas, a niños y adultos.
- Ingestión del suelo: Los receptores son esencialmente los niños, además puede afectar a herbívoros y a la vida silvestre en general.
- Incidencia en aguas superficiales o subterráneas: afecta significativamente la vida acuática, si el agua contaminada es bebida puede presentar riesgos para la población general.
- Afecta la producción de carnes o leche.
- Las migraciones de los contaminantes afectan al ecosistema y a la población en general.

Existen también compuestos como el benceno que incrementan la frecuencia de leucemia, el tolueno que afecta el sistema nervioso, el xileno además de afectar el SNC puede provocar neumonitis, daño renal y hepático.

Método Soxlet

Según (USEPA 1996; SZOLAR *et al.*, 2002; DOF, 2006; PARRA *et al.*, 2014), este método tiene por finalidad la extracción cíclica sólido-líquido, que transfiere un analito de una matriz, respecto a sustancias orgánicas su afinidad depende de los polos de esta. Al elegir un solvente se debe aplicar en la extracción y las circunstancias de la operatividad del equipo, la eficiencia de la extracción por el solvente dependerá del tiempo de la operatividad del equipo en las muestras de suelos. Luego se determinó la gravimetría aplicando los métodos D5369-93 (ASTM, 2003) y la US EPA 1996 (3540C) y la US EPA 1994 (3541).



Figura 6. Dispositivo de extracción Soxhlet (CELA *et al.*, 2002)

Legislatura ambiental en referencia a la calidad del suelo

Según el MINAM (2017), en la legislatura ambiental se pretende

prevenir la alteración de forma negativa al suelo, que se fundamenta en buenas prácticas ambientales en cada proceso productivo, la cual se tiene la finalidad de evadir la contaminación de los recursos naturales.

Según el MINAM (2017), en el Perú, el Estándar de Calidad Ambiental para el suelo – D.S. N° 011-2017, se precisa la congregación o concentración de los parámetros mecánicas, sintéticos y orgánicos en el suelo; en su condición de receptor, que no presenta riesgo considerable para la salud en el hombre ni a la naturaleza, luego se deberá iniciar el proceso de remediación de las zonas alteradas, y se deben aplicar criterios para una remediación de los suelos alterados, que están presentes en la normativa citada. A continuación, se puede apreciar que el cuadro 14, contiene la relación de los valores de los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo según el Ministerio del Ambiente.

Cuadro 14. Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo

Parámetros en mg/kg Ps	Usos del suelo			Métodos de Ensayo
	Suelo Agrícola	Suelo Residencial/ Parques	Suelo Comercial/ Industrial/ Extractivo	
ORGÁNICOS				
Hidrocarburos aromáticos volátiles				
Benceno	0.03	0.03	0.03	EPA 8260 EPA 8021
Tolueno	0.37	0.37	0.37	EPA 8260 EPA 8021
Etilbenceno	0.082	0.082	0.082	EPA 8260 EPA 8021
Xilenos	11	11	11	EPA 8260 EPA 8021
Hidrocarburos poliaromáticos				
Naftaleno	0.1	0.6	22	EPA 8260 EPA 8021 EPA 8270
Benzo(a) pireno	0.1	0.7	0.7	EPA 8270
Hidrocarburos de Petróleo				
Fracción hidrocarburos (C6-C10)	de F1 200	200	500	EPA 8015
Fracción hidrocarburos (>C10-C28)	de F2 1200	1200	5000	EPA 8015
Fracción hidrocarburos (>C28-C40)	de F3 3000	3000	6000	EPA 8015
Compuestos Organoclorados				
Bifenilos policlorados - PCB	0.5	1.3	33	EPA 8082 EPA 8270
Tetracloroetileno	0.1	0.2	0.5	EPA 8260
Tricloroetileno	0.01	0.01	0.01	EPA 8260

Cuadro 14. Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo (continuación...)

Parámetros en mg/kg Ps	Usos del suelo			Métodos de Ensayo
	Suelo Agrícola	Suelo Residencial/ Parques	Suelo Comercial/ Industrial/ Extractivo	
INORGÁNICOS				
Arsénico	50	50	140	EPA 3050 EPA 3051
Bario total	750	500	2 000	EPA 3050 EPA 3051
Cadmio	1.4	10	22	EPA 3050 EPA 3051
Cromo total	**	400	1 000	EPA 3050 EPA 3051
Cromo VI	0.4	0.4	1.4	EPA 3060/ EPA 7199 o DIN EN 15192
Mercurio	6.6	6.6	24	EPA 7471 EPA 6020 ó 200.8
Plomo	70	140	800	EPA 3050 EPA 3051 EPA 9013 SEMWW-
Cianuro Libre	0.9	0.9	8	AWWA-WEF 4500 CN F o ASTM D7237 y/ó ISO 17690:2015

Fuente: MINAM, 2017

B) Cadmio

Según RODRIGUEZ (2001), y DAS *et al.*, (1998), la presencia del cadmio como mineral existe en representación de sulfuro de cadmio y también se encuentra zinc a la vez. A la vez existe como sustituto en la apatita y la calcita como en ciertos fertilizantes de fosfatos.

Según GARCIA (2002), lo más resaltable del cadmio es su alta firmeza al deterioro, su punto de ebullición es bajo y su buena conductividad eléctrica. El cadmio es persistente a la acción de compuestos sintéticos y a temperaturas muy altas.

Efecto tóxico del cadmio

Según ROHLER y KORTE (1982), debido a los procesos físicos como el viento, erosión y procesos biológicos, el cadmio se trasfiere de un lugar a otro y se ve afectado más aún por la mano del hombre alterando el ciclo biogeoquímico del cadmio (Figura 7 y 8).

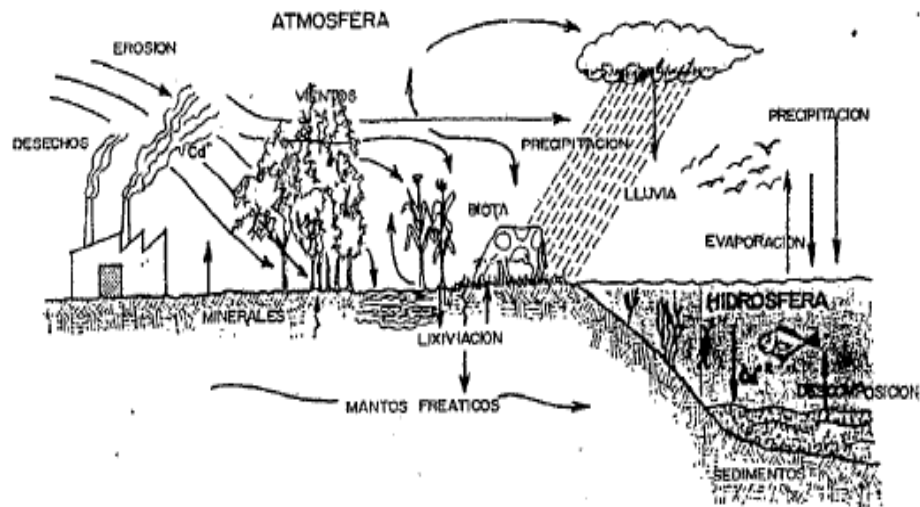


Figura 7. Período biogeoquímico del cadmio (ROHLEDER y KORTE, 1982).

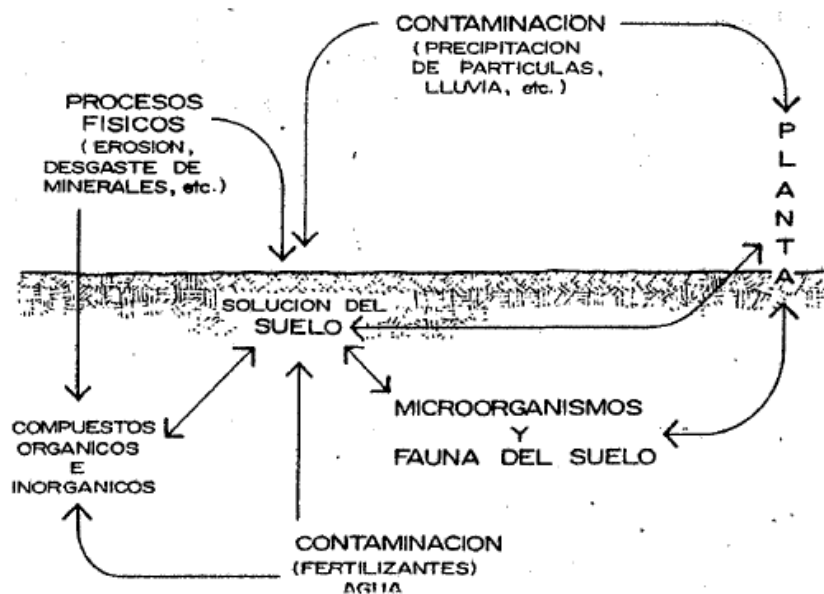


Figura 8. Transmisión en el suelo con presencia del cadmio (ROHLEDER y KORTE, 1982).

C) Boro

El boro se encuentra en rocas ígneas y arenosas generalmente en forma de turmalina, mineral de poco valor para las plantas. El elemento

acumulado en suelos de pizarra o arcilla, de origen marino, o de residuos de las plantas, tiene amplia aprovechabilidad (WALLACE, 1943).

Los suelos varían ampliamente en la cantidad y distribución del boro utilizable, lo cual puede deberse a condiciones de origen, prácticas de cultivo, medio ambiente, suministro de humus y erosión, principalmente (SCHULTER y STEPHENSON, 1940).

El boro aprovechable es generalmente mucho mayor en los primeros 90 cm. del suelo, siendo a menudo la escasez muy pronunciada a profundidad mayor que ésta. Según BERGER y TROUGH (1939), la concentración del boro que se analiza del suelo, no es índice para fertilizar con este elemento, puesto que sólo menos de un 5 % del total está en forma utilizable.

La disponibilidad del elemento está asociada con propiedades como el pH y la textura. Quemadas sobre el suelo han ocasionado aumento en la cantidad de boro soluble (BAIRD, 1952).

En condiciones climáticas de fuertes lluvias y de suelos muy ácidos la cantidad de boro es reducida a niveles bajos por lixiviación. En suelos de poca lluvia se encontró un contenido de boro total de 4 a 88 ppm. (partes por millón), variando su contenido de elemento utilizable entre 0,4 y 64,8 ppm. La cantidad de boro aprovechable está relacionada con la reacción del suelo, así: suelos ácidos tienen alta disponibilidad y suelos alcalinos baja, por esto un sobre

encalamiento puede conducir a deficiencia de boro. Regiones áridas muestran alto contenido de este elemento en sus suelos (MILLAR, 1955; ASKEW, 1951).

Toxicidad del boro para las plantas

El boro es tomado por los vegetales en proporciones mínimas, una cantidad mayor de la indispensable causa toxicidad prácticamente en todas las plantas. La susceptibilidad a exceso de boro varía de acuerdo con la especie de planta y otros factores como, vigor de ella, condiciones ambientales y características del suelo. Para abonar suelos deficientes en boro se puede tomar como máximo unos 56 kg por Ha (MILLAR, 1955).

D) Plomo

Según la ATSDR, (1999) y UBILLUS (2003), el plomo influencia en las fuentes artificiales y naturales, llegando al final a sufrir cambios gracias a diversos factores que pasa por los factores naturales y artificiales en la biosfera. Los registros de las concentraciones del plomo en la naturaleza, son complicados de obtener gracias a la alteración del ambiente causada por la actividad del hombre y la propia industria.

Según BINGÖL y AKÇAY (2005), para la determinación del plomo en el suelo es recomendable usar la técnica de Absorción Atómica en Flama (FAAS). Debido a la fácil manipulación del equipo y su bajo costo de operatividad, pero hay limitada sensibilidad para determinar el plomo, para ello

se requiere una separación del analito antes de poder analizar la muestra.

E) Cobre

Según McKean (1993), es fundamental para la actividad metabólica de las plantas. Es importante para la fotosíntesis de las plantas, como también para la clorofila y la concentración del nitrógeno en las plantas. Una escasa concentración del Cu puede generar el crecimiento reducido como la necrosis de las hojas tiernas jóvenes por una deficiente obtención del hierro y una mínima cantidad en el incremento de las raíces.

F) Acidez intercambiable (Al^+ e H^+)

Cuando el valor de saturación con Al^{+3} en el suelo supera el 60 %, la concentración de este elemento en la solución del suelo es superior a 3 ppm, cantidad que es tóxica para la mayoría de las plantas no tolerantes (EVANS y KAMPRATH, 1970).

Se ha demostrado que el Al^{+3} es el catión asociado a la acidez de los suelos. Los iones H^+ liberados en el proceso de mineralización de la MO pueden reaccionar con las estructuras cristalinas de las arcillas liberando aluminio y ácido silícico a la solución del suelo (COLEMAN y THOMAS, 1967). La principal reacción que se presume ocurre cuando suelos o arcillas saturadas de Al son extraídas con soluciones de sales neutras, es el intercambio de Al^{+3} adsorbido por el catión desplazante (GALLEZ *et al.*, 1976).

De otra parte, el Al^{+3} intercambiable puede estar retenido fuertemente y su extracción por sales neutras es dependiente, en gran medida, de la concentración y naturaleza de la sal añadida. Las titulaciones potenciométricas distinguen el Al intercambiable del no intercambiable como fuente de acidez; mientras que las titulaciones conductométricas no distinguen del todo entre estas dos formas, pero si distingue H^+ intercambiable del Al^{+3} (COLEMAN y THOMAS, 1964).

Cuadro 15. Categorización de los suelos de sus cationes Intercambiables

Cationes	% de rebose de bases y aluminio en la fase de permutación						
	Muy	Bajo	Moderadamente	Mediano	Moderadamente	Alto	Muy
	Bajo		Bajo		Alto		Alto
Potasio*	< 1.0	1.1 _ 2	2.1 _ 3	3.1 _ 4	4.1 _ 6	6.1 _ 10	> 10.1
Calcio	< 25	26 _ 40	41 _ 60	61 _ 75	76 _ 80	81 _ 85	> 86
Magnesio	< 3	4 _ 5	6 _ 10	11 _ 15	16 _ 20	21 _ 30	> 30
Sodio	< 1	1 _ 2	2.1 _ 3	3.1 _ 5	5.1 _ 10	10.1 _ 20	> 20
Aluminio	0	0 _ 2	2 _ 5	5 _ 15	15 _ 30	30 _ 60	> 60

Fuente: CASTELLANOS, 2000

G) Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva (CICe)

El CICe es la suma de Cationes Intercambiables de un suelo, conteniendo la Acidez titulable ($Al^+ + H^+$). La CICe evalúa solamente los puestos que están ocupados. Generalmente su valor es menor a la CIC (GARRIDO, 2001).

Cuadro 16. Niveles de CICE en el suelo.

Niveles	Valores (meq/100g de suelo)
Baja	< 1.5
Medio	1.5 – 4.0
Alta	> 4.0

Fuente: SCHARGEL y DELGADO, 1990

H) El Magnesio y el Calcio

Según MOLINA (1998), en suelos de tendencia acidas se registra poca cantidad de cationes intercambiables, la cual se dispone de poca presencia de los cationes de calcio o magnesio, trayendo consigo como efecto negativo el poco crecimiento adecuado para las siembras.

Cuadro 17. Tabla con la interpretación de los análisis de suelos

Cationes y Aniones	Unidades de medida	Clasificación de interpretación de análisis de suelos			
		Bajo	Medio	Optimo	Alto
pH		< 5.0	5.0 – 6.0	6.0 – 7.0	> 7.0
Ca	ppm	< 4.0	4.0 - 6.0	6.0 - 15.0	> 15.0
Mg	ppm	< 1.0	1.0 - 3.0	3.0 – 6.0	> 6.0
K	ppm	< 0.20	0.2.0 – 0.5.0	0.50 – 0.80	> 0.80
Acidez	ppm		0.3 - 1	< 0.30	> 1.0
Sat. Ac.	%		10 - 30	< 10.0	> 30.0
P	ppm	< 12	12 - 20	20.0 - 50.0	> 50.0
Fe	ppm	< 5	5 - 10	10.0 – 50.0	> 50.0
Cu	ppm	< 0.5	0.5 - 1	1.0 - 20.0	> 20.0
Zn	ppm	< 2.0	2 - 3	3.0 - 10.0	> 10.0
Mn	ppm	< 5	5 - 10	10.0 - 50.0	> 50.0
B	ppm	< 0.2	0.2 – 0.5	0.50 - 1.0	> 1.0
S	ppm	< 12	12 - 20	20 – 50	> 50.0
M.O	%	< 2	2 - 5	5 - 10	> 10.0
Ca/Mg				2 – 5	
Ca/K				5 – 25	
Mg/K				2.5 – 15	
(Ca+Mg)/K				10 - 40	

Fuente: MOLINA y MELÉNDEZ, 2002.

I) Potasio (K)

El potasio se encuentra en el suelo en distintos silicatos que forman parte de las rocas de origen magmático tales como micas, feldespatos, etc. También se combina con la materia orgánica, aunque por su escasa transformación en formas minerales es poco importante. Además, existen formas iónicas libres en la solución del suelo, adsorbidas en el complejo de cambio y fijadas en determinadas arcillas (GARCÍA *et al.*, 2009)

Cuadro 18. Rangos del potasio según la textura del suelo

Potasio (ppm)	Arenoso	Franco	Arcilloso
Muy bajo	0 al 60	0 al 80	0 al 100
Bajo	61 al 120	81 al 160	101 al 200
Medio	121 al 180	161 al 235	201 al 300
Alto	181 al 300	236 al 390	301 al 490
Muy alto	Mayores de 300	Mayores de 390	Mayores de 490

Fuente: INIA, 2009

J) Nitrógeno (N)

Las concentraciones de nitrógeno y fósforo asimilables presentes en el suelo, suelen ser limitantes para un incremento y activación de la población microbiana, mientras que otros nutrientes esenciales como el Ca^{+2} , Na^{+} , Fe^{+2} y SO_4^{-2} ya están presentes en cantidades suficientes en el suelo (MENN et al., 2000). La adición de fuentes de N y P inorgánicas, generalmente tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados (CHAINEAU et al., 2003). Las proporciones molares de C:N:P, descritas en la bibliografía, respecto al contenido de carbono a degradar son muy distintas. La EPA recomienda utilizar proporciones C:N de 100:10 a 1000:10 para la biodegradación de suelos contaminados por hidrocarburos (U.S. EPA, 1995), y dentro de este intervalo se han descrito proporciones C:N de 600:10, 500:10 y de 100:10:1 a 300:10:1 respecto al C.O a degradar (DIBBLE y BARTHA, 1979).

Cuadro 19. Rangos del nitrógeno total en el suelo

CATEGORIA	NITRÓGENO TOTAL %
Muy bajo	< 0.05
Bajo	0.05 - 0.10
Medio	0.10 - 0.15
Alto	0.15 - 0.25
Muy alto	> 0.25

Fuente: NOM-021-RECNAT-2000

2.3.3. Propiedades microbiológicas

A) Densidad de la población microbiana

El suelo normalmente contiene gran número de microorganismos diversos incluyendo bacterias, algas, hongos, protozoos y actinomicetos. Los suelos agrícolas poseen una importante población autóctona de microorganismos, sin embargo, suelen realizarse aplicaciones de microorganismos cultivados o enmiendas orgánicas como estiércol animal, viruta de madera, material vegetal, etc. La incorporación de estiércol sirve para aumentar la población microbiana y proporcionar nutrientes adicionales. Dichos organismos necesitan minerales inorgánicos para poder promover su incremento bacteriano y mantener sus procedimientos de degradación biológica; estos nutrientes pueden estar disponibles en cantidades suficientes en los suelos, pero generalmente se deben agregar como fertilizantes agrícolas para mantener las poblaciones bacterianas.

Las bacterias que utilizan el oxígeno para su ATE son aeróbicas; son las necesarias para un compuesto distinto de la suministración del oxígeno, son también células que no necesitan oxígeno; y también hay quienes son de funcionabilidad mixta, también existen los de ATE que son de actividad facultativa. Para biodegradar productos del petróleo solo los microorganismos que son aeróbicos (o facultativos) y heterótrofos son importantes en el proceso de degradación. Con el fin de evaluar la presencia y actividad de una población microbiana autóctono para una biodegradación del petróleo, también deben realizarse estudios en los laboratorios en muestras de suelos, que, como mínimo, deben incluir recuentos en placa de bacterias heterótrofas totales (UFC/gr del suelo). Las densidades de población microbiana de suelos en un rango típico van del orden de 10^4 a 10^7 UFC/gr de suelo. Para que el sistema suelo-contaminante-microorganismos sea eficaz el recuento de heterótrofo mínimo deberá ser 10^3 UFC/gr. Si la densidad poblacional es baja e insuficiente, la población puede incrementarse agregando microorganismos comerciales o cultivados ad hoc (BELTRÁN *et al.*, 2018).

Cuadro 20. Relación microbiana y la efectividad biológica

Recuento de microorganismos heterótrofos totales y efectividad de un biotratamiento	
Microorganismos Heterótrofos Totales	Efectividad
> 1000 UFC/gr suelo seco	Generalmente efectivo.
< 1000 UFC/gr suelo seco	Puede ser efectivo, pero necesita profundizar las pruebas de toxicidad para verificar condiciones tóxicas.

Fuente: IRAM 29555-1:2003

2.4. Biorreactores

Según CASTILLO *et al.*, (2005), los equipos que son biorreactores de suspensión se usan para una recuperación de un espacio alterado. Los suelos alterados se inducen en dicho biorreactor con suficiente agua para poder realizar una mezcla cíclica. La cantidad de agua de la mezcla dependerá de la saturación de los agentes contaminadores.

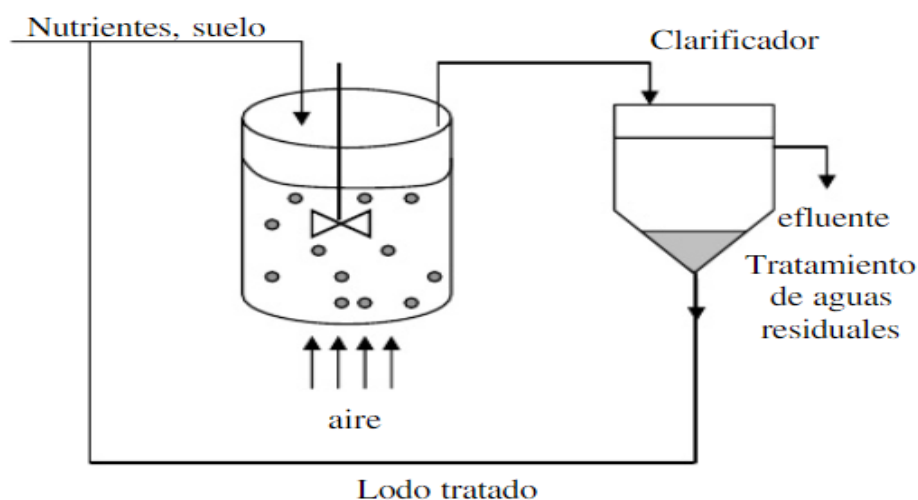


Figura 9. Biorreactor en fase líquida (SOLANAS, 2009)

2.4.1. Biorreactor de Air Lift

Según AGUAYO (2005), la aplicación de un método biológico de tipo Air Lift, trata en una columna en su interior se halla un líquido móvil que se contiene en ella un medio en suspensión y en la fase siguiente de una renuencia de un vapor acuoso.

Según LÓPEZ (1998); MIRANDA *et al.*, (2006), los reactores de tipo Air Lift están hechos con una cámara cilíndrica que se contiene ahí el medio de cultivo en un vidrio, también hay un tubo deflector en el centro, con un medio con contenido de NaCl con filtros de aire, el arranque de aire fue impulsada por una bomba de aire de pecera que suministra un caudal de 1,100 mL/min O₂.

2.4.2. Componentes que afectan en proceso de operatividad en los biorreactores Air Lift

A) Temperatura

Según VERGARA *et al.*, (2005), gran parte de los organismos mesófilos, pueden cumplir funciones metabólicas a rangos de temperaturas que van desde los 10 °C a los 35 °C.

Según QUIROZ (2003), en temperaturas muy altas se puede generar ciertas renuencias metabólicas de los organismos haciendo que pase rápidamente, generando una disrupción metabólica y se reduce posteriormente,

trayendo consigo una mayor eficacia de destrucción de los contaminantes en el biorreactor.

B) pH

Según MADIGAN *et al.*, (1999), la concentración del pH de los medios se debe ajustar a 7, la cual las bacterias tales como: los Acinetobacter y las Pseudomonas; son neutrófilas y su pH ideal de incremento es 7. Donde las bacterias se reproducen en ese pH, se estabiliza en la sustancia o medio de pH neutro; este proceso ocurre gracias a una permutación de iones entre la sustancia y las células con la finalidad de tener una estabilidad osmótica.

Según SIN HA y KUMAR, (2009), el pH de la sustancia se alcaliniza con el tiempo luego de 96 horas de incremento bacteriano, el incremento en el pH existe una probabilidad que se vincule con la mutación a un género insoluble de la bacteria o su entorno.

C) Disponibilidad de oxígeno (OD)

Según BALLERINI *et al.*, (1998), la molécula de oxígeno establece aceptar electrones que se debe administrar en un espacio acuoso de manera que las colonias puedan iniciar su actividad metabólica y perdurar.

Según SCRAAG (2002), la molécula de oxígeno es la sustancia restrictiva de la aceleración de la reproducción, cuando la siembra esta en incremento poblacional, la dinámica de ingreso de oxígeno ($F_i O_2$) será más a la

dinámica de retiro del oxígeno ($F_f O_2$), esto sucede en el uso del oxígeno diluido en una sustancia acuosa por parte de los organismos en incremento y/o segmentación celular.

D) Microorganismos

Según RATHOR et al., (2003), los organismos perfeccionados en una bio-película, son elementos de mayor operatividad tediosa en el biorreactor Air lift, a la vez estos generan, devastan o transmutan el agente alterador de forma negativa. El consorcio bacteriano necesita condiciones en su contorno, considerando variables como el pH, los nutrientes y la temperatura.

E) Biopelículas microbianas

Según STEWART (2003), y MARTINEZ *et al.*, (2006), son la anexión y la encapsulación de organismos del ambiente de una sustancia polimérica extracelular (SPE) en una forma compleja de micro biotopos en el transporte espacial de diversos organismos con asimilaciones sinérgicas e incremento lento, la cual en su limitado organismo se reproduzcan y se establezcan en circunstancias sintéticas beneficiosas en el aumento de la población selectiva.

F) Control de biomasa

Según QUIROZ (2003), hay una interrelación entre el control de la biomasa y la efectividad de supresión de los agentes perjudiciales, en

consecuencia, es efectivo en el rendimiento del sistema. Esto pasa por la presencia de bio-películas en la superficie y el transporte equitativo en el reactor, la cual es importante para esta operación y certera en un biorreactor Air Lift.

2.5. CALIDAD DEL SUELO

Para IDOWU *et al.*, (2008), en el presente esquema conciso de la efectividad (calidad) del suelo, sincronizando las propiedades mecánicas, sintéticas y orgánicas; se puede apreciar en la Figura 10.

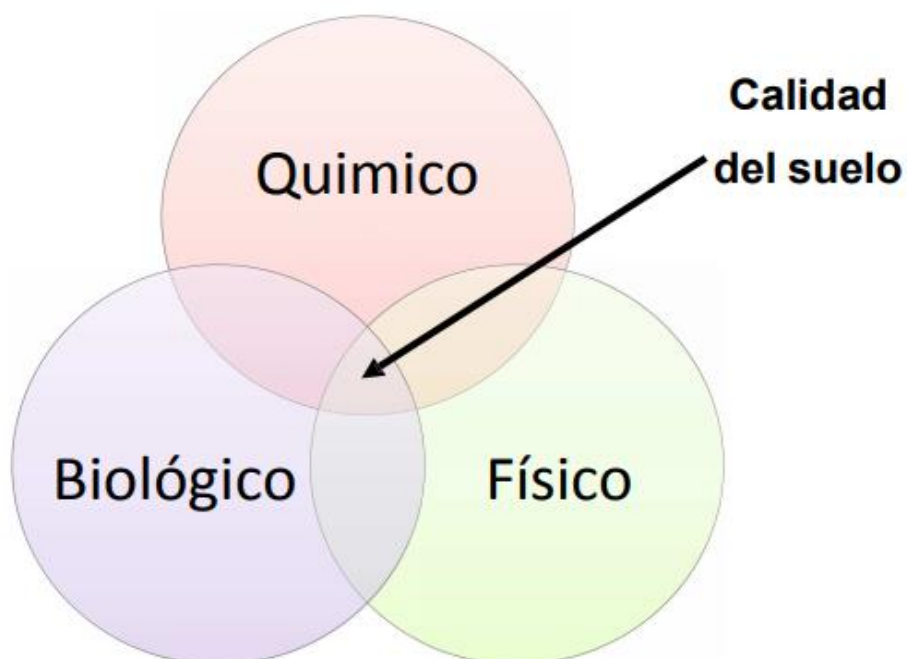


Figura 10. Integración de las propiedades físicos, químicos y biológicos en la calidad del suelo (IDOWU *et al.*, 2008)

Según LAL (1994), la efectividad en los suelos (calidad) es la respuesta a las técnicas la cual hace referencia a las capacidades mecánicas,

bióticas y químicas añadidas el proceso climático en su alrededor y a la manipulación de los suelos. A continuación, en la Figura 11, se aprecia dicha relación.

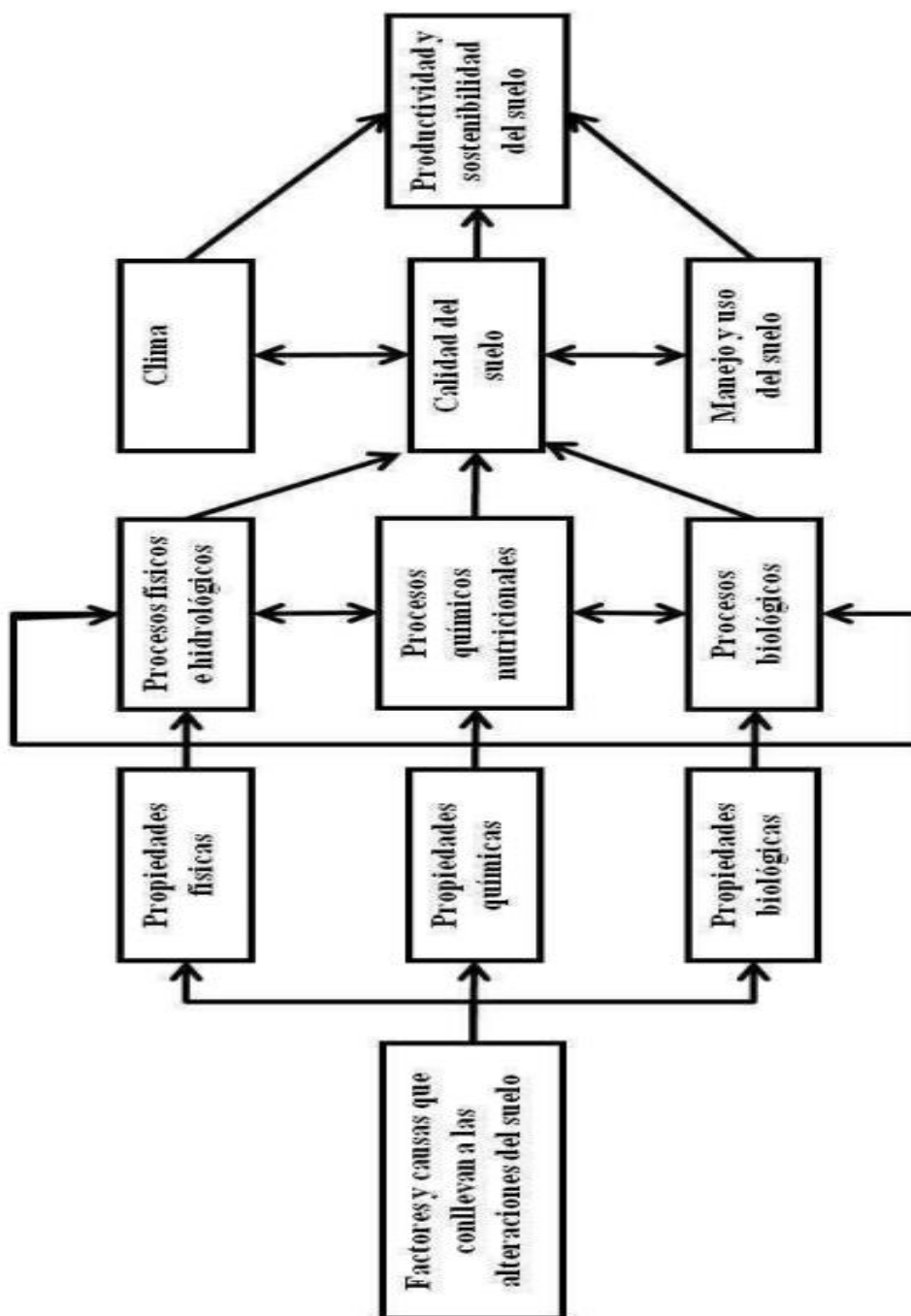


Figura 11. Procedimientos y las propiedades en relación a la eficacia y su sustentabilidad en el suelo (LAL, 1994).

2.5.1. Erosión de los suelos

Según BARROW (1991), la erosión de suelos es un suceso donde uno o más funcionalidades naturales de los suelos son degenerativas. También, se establece que el proceso de la aridificación se aplica para la erosión generada por el hombre como también debido a causas naturales.

Características de la degradación de los suelos

Según la FAO (1994), y el ISRIC (1995), los tipos de degradación de suelos se describen a continuación:

A) Degradación

Se observan dos principales formas de la realización de la degradación, la cual se detalla líneas siguientes:

Según la FAO (1994), y el ISRIC (1995), la degradación acuática es el transporte de materiales a través del suelo con influencia del agua, donde trae problemas negativos. La substracción de la extensión del suelo, oprime su contenido de producción y en algunos casos se minimiza la fertilidad de los suelos y se cubre usando fertilizantes para su mejoría en la productividad.

Según la FAO (1994), y el ISRIC (1995) la degradación eólica es el transporte de materiales del suelo con influencia de los vientos generando una

pérdida de la superficie vegetal también por el exceso pastoreo.

B) Degeneración química

Según la FAO (1994), es el proceso de variación de los micro elementos y macro elementos presentes en la naturaleza. Las cuales se categorizan de la siguiente forma:

- **Desgaste de fertilización:** Se observa en lugares donde no exista fertilización al suelo.
- **Desgaste en material orgánico:** Se observa cuando existe una excesiva presencia de material herbario de plantíos o roces.
- **Salinidad en los suelos:** Se observa por la mala irrigación o aguas con alta concentración de minerales. En zonas donde existe alta precipitación y ocurre una evapotranspiración es cuando el proceso se incrementa de alcalinización.
- **Suelos ácidos:** Ocurre cuando hay una inadecuada fertilización.
- **Contaminación:** Ocurre cuando existe mucha cantidad de plaguicidas como fertilizantes, vertimiento de derivados de petróleo entre otros.

C) Degeneración mecánica

Según ISRIC (1995), la actividad de compactación debido a la manipulación de las maquinarias, la infiltración y sellado se encuentra en suelos

limpios, en consecuencia, son vulnerables estos suelos con deficiente cantidad de materia orgánica.

2.6. Procesos en remediación

2.6.1. Procesos de remediación biológicas

Se utiliza una diversidad de procesos que utilizan organismos vivos para biodegradar compuestos orgánicos tóxicos a productos pocos tóxicos. Normalmente se consigue suministrándose aire, minerales, bacterias y/u hongos (bioaumentación), también ver el control de temperatura y pH (VAN DEUREN *et al.*, 1997).

A) Biotratabilidad

Los estudios de tratabilidad permiten descartar que la toxicidad del contaminante o las condiciones del suelo natural impidan la actividad biológica. Las pruebas deben planificarse para que los parámetros evaluados sirvan para diseñar e implementar el sistema constructivo y operativo de la celda de landfarming o de la biopila. Si estos estudios no demuestran aptitud, se necesitarán estudios piloto antes de realizar el tratamiento en gran escala. Estos estudios deben proporcionar datos sobre:

- Biodegradabilidad de contaminantes.

- Capacidad de los microorganismos indígenas para degradar los contaminantes.
- Condiciones de crecimiento óptimo.
- Tasas de biodegradación y
- Requerimiento de nutrientes naturales y minerales.

En el cuadro 21, se reporta análisis físicos y químicos a realizar sobre muestras de suelo del sitio para estudios de biotratibilidad.

Cuadro 21. Parámetros físicos y químicos para una biorremediación

Parámetros físicos y químicos para estudios de biotratibilidad	
Parámetro	Propiedades que mide
Toxicidad del suelo	Tipo y concentración del o los contaminantes metales pesados presentes, pH
Textura del suelo	Granulometría, contenido de arcillas, contenido de humedad, porosidad, permeabilidad, densidad aparente
Nutrientes	Nitratos, fosfatos, aniones y cationes.
Biodegradabilidad del contaminante	Concentración de Carbono orgánico total (COT), volatilidad, estructura química.

Fuente: IRAM 29555-1:2003

Los resultados analíticos permiten determinar calidad y concentración de contaminantes en los suelos; evaluar la concentración inicial de los contaminantes presentes en las muestras iniciales, para que pueda evaluarse evolución de la concentración; determinar si los macronutrientes

(nitrógeno y fósforo) están presentes en concentraciones requeridas para sustentar los niveles incrementales de actividad microbiana y finalmente, evaluar parámetros que pueden promover o inhibir el crecimiento microbiano.

La degradación, simulada en un mesocosmo (escala de laboratorio), se mide por la reducción de la concentración de contaminantes y los cambios en la población microbiana y otros parámetros de seguimiento en función del tiempo. Una evaluación del biotratamiento puede incluir los siguientes tipos de estudios:

- **Control de actividad microbiana:** mide la velocidad a la que los microorganismos existentes pueden degradar a los contaminantes en condiciones aerobias sin la adición de nutrientes suplementarios.
- **Ajuste de nutrientes:** permiten calcular la proporción óptima C:N:P para alcanzar velocidades de degradación máximas en ensayos preparados con diferentes concentraciones de nutrientes.
- **Necesidad de inoculación o bioaumentación:** los ensayos se inoculan con consorcios o bacterias biodegradadoras y se analiza para determinar si efectivamente aumentan la tasa de degradación.
- **Ensayos de control (blancos):** permiten medir la velocidad de degradación debido solo a procesos fisicoquímicos del suelo (abióticos). Permiten comparar con los otros ensayos que se basan en los procesos biológicos.

Luego de haber comprobado, en escala experimental, que el biotratamiento será potencialmente eficaz, se procede a diseñar el sistema para aplicar.

B) Biotransformación

Según MCCULLOUGH *et al.*, (1999), los metales pesados en el ecosistema no pueden ser degradados; excepto, con la presencia de bacterias que pueden transformarla y respeta al proceso de oxidación; influyendo en el transporte de los metales pesados en el suelo, en ocasiones se incrementa en el proceso de solubilidad de ciertos productos afectados, beneficiándose así su supresión, como en ocasiones disminuye su transporte de los metales pesados en el suelo.

C) Bioestimulación

En el proceso de bioestimulación implica la nutrición y/ oxigenación en el suelo alterado, con presencia de bacterias propias del suelo extraído, que se usan para el mejoramiento de los suelos alterados con agentes tóxicos orgánicos para inhibirlo y degradar dichos contaminantes en el lugar contaminado.

Este método es aplicado en el tratamiento de suelos inoculados que contienen derivados del hidrocarburo como también ciertos plaguicidas. También presenta ciertas restricciones la cual no es sugerible esta tecnología en suelos arcillosos, altas en estratificación o suelos heterogéneos, debido a las

restricciones en el transporte de O₂ (ALEXANDER, 1994; VAN DEUREN *et al.*, 1997).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Zona de realización

En la investigación presente, fue realizado en los laboratorios que detallaré a continuación: laboratorio de Análisis de Suelo, agua y Ecotoxicología; laboratorio de Microbiología General y el laboratorio de Conservación de suelos en la Universidad Nacional Agraria de la Selva, provincia de Leoncio Prado y departamento de Huánuco, cuya muestra del suelo se extrajo de la refinería de petróleo de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L. de la ciudad de Pucallpa.

3.1.1. Ubicación política

- Región: Huánuco
- Provincia: Leoncio Prado
- Distrito: Rupa Rupa
- Lugar de ejecución: Universidad Nacional Agraria de la Selva
- Zona de estudio: Refinería de petróleo de Maple Gas Corporation del Perú S.R.L. de la ciudad de Pucallpa.

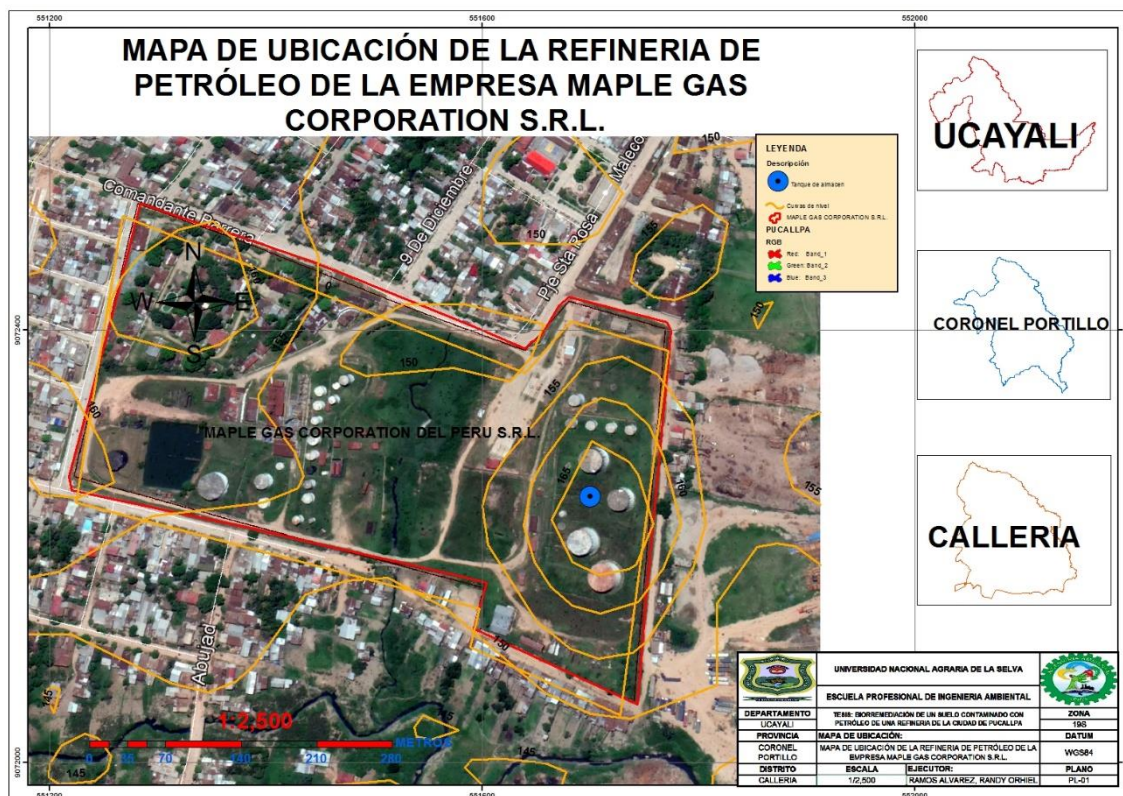


Figura 12. Mapa de la zona de estudio

3.2. Factor climatológico y geográficos

3.2.1. Tiempo

Según SENAMHI (2010), en la ciudad de Tingo María, se tiene un ambiente caluroso y fresco, que presenta diferencias debido a la diferenciación como el calor y las lluvias.

En la ciudad de Tingo Maria, la temperatura promedio puede ser de 20 °C con un mínimo de 18 °C y un máximo de 38 °C, la cual expresan ciclos variables en temperatura.

3.2.2. Geología

Según SINIA (2016), la ciudad de Tingo María presenta una geología de una Era que es Cenozoica, un Sistema que es Cuaternario, una Serie que es Holoceno, la unidad estratigráfica de depósitos fluviales, con una composición litológica de Depósitos fluviales – Gravas y arenas en matriz limo arenosa, incluye conos aluviales y de simbología (Qh-fl).

3.2.3. Geomorfología

Según INGEMMET (2019), la ciudad de Tingo María presenta una geomorfología que se denomina Llanura o planicie aluvial (PI-al) donde son terrenos ubicados encima del cauce y llanura de inundación fluvial también son considerados terrenos planos, de ancho variable.

3.3. Metodología

3.3.1. Fase recolección de información

- Recopilación de información

Se procedió a recopilar información de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L., sobre incidentes existidos sobre derrames de petróleo refinado, como también se extrajo muestras de suelos luego se llevó a procesarlos y analizarlos en la Universidad Nacional Agraria de la Selva en el Cuadro 22, se aprecia los puntos de muestreos de los suelos extraído de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L.

Cuadro 22. Coordenada del muestreo del suelo en la refinería

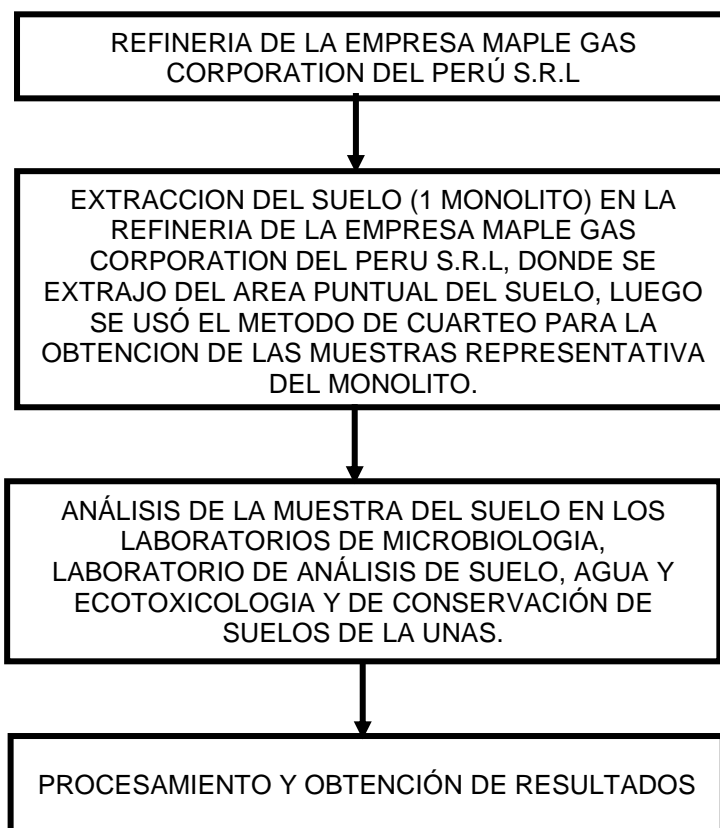
Punto geográfico de la muestra de suelo			
Puntos de referencias	ESTE	NORTE	ALTITUD
TANQUE DE ALMACEN (a 5 m de distancia)	551699.97	9072245.91	151 m.s.n.m

3.3.2. Fase de campo

A. Toma de muestras para evaluación

Se extrajo un monolito de suelo cuya coordenada UTM son: (el primer punto Este: 551699.97, Norte: 9072245.91, Altitud: 151 msnm) cuya área es de 40 x 40 cm con una profundidad de 30 cm y se hizo la extracción representativa por el método del cuarteo por el método B, que consiste en colocar la muestra traída del campo sobre una superficie dura no absorbente, limpia y nivelada; se mezcló totalmente y se formó una pila cónica miniatura, con ayuda de un palustre o cucharón. Se aplanó el cono apretándolo con el palustre. Una vez que se logre un espesor uniforme y una figura regular, se cuarteó el material cortándolo por diámetros normales entre sí que al final se tuvo cuatro porciones iguales, de las cuales se descartaron dos diagonalmente opuestas y se repitió el proceso hasta obtener la muestra del tamaño deseado, de ello se tomó 2 Kg de suelos como muestra final en una bolsa de primer uso, rotulado, y posteriormente fue trasladada a los laboratorios de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, para su respectivo secado al aire libre y análisis de las muestras (AASHTO T248, 2014)

Cuadro 23. Flujograma de procesos para el análisis del suelo contaminado



3.3.3. Fase de gabinete

Se realizó mapas temáticos de la zona de estudio con el uso del Google Earth (2019) y ArcMap (10.3), el análisis estadístico e interpretación de los datos recopilados de la se realizó a través de los programas en Microsoft Excel (2016) y SPSS 23, las cuales se realizó los mapas temáticos y los análisis estadísticos.

3.4. Unidad experimental

- Bacterias autóctonas del suelo con capacidad remediadora.
- Suelo contaminado con petróleo para aislar los microorganismos.

3.5. Determinación de las propiedades físicas, químicas y biológicas

3.5.1. Determinación de las propiedades físicas del suelo

A. Determinación de la permeabilidad

Se aplicó el método de la permeabilidad variable, donde el equipo fue instalado previamente por el responsable del laboratorio de Conservación de suelos, así como la preparación del suelo. Se colocó la columna de entrada de agua y se dejó que fluya hasta que culmine el agua filtrada por la columna hasta saturar el suelo y luego tomar mediciones posteriores. Después de este tiempo, se determinó el tiempo de transcurso del flujo del agua a través del permeámetro (DAS, 2019).

B. Determinación de la conductividad Hidráulica

Se determinó la conductividad hidráulica, usando el método del Permeámetro de carga constante la cual es un método a nivel de matriz de suelo. El método se utilizó para la muestra inalterada y después de la saturación se provee una alimentación de agua a una carga constante, con lo que el agua se mueve a través de la muestra hasta alcanzar un régimen de equilibrio en base a la medida del caudal de salida desde el permeámetro, así como la diferencia de carga entre la superficie del nivel constante y el nivel de agua en la salida (COELLO, 2005).

Resolviendo la ecuación de Darcy al término de conductividad, se obtiene la siguiente ecuación:

$$K_s = \frac{Q}{T \times A} \times \frac{1}{L+d}$$

K_s : Conductividad hidráulica saturada (cm/h)

Q : Volumen de flujo de agua a través de la sección A (cm³)

T : Tiempo (h)

L : Altura de la muestra de suelo (cm)

d : Altura de agua (cm)

C. Determinación del color del suelo

La determinación del color del suelo, se realizó con los diferentes patrones de color establecidos en la tabla Munsell. La tabla Munsell es un sistema de notación de color basado en una serie de parámetros que permitió identificar el color del suelo ya que varían en función del matiz, brillo y croma (MUNSELL, 1994).

D. Determinación de moteados en el suelo

Se determinó los moteados por las manchas de diferentes colores o sombras del color intercalado con el color dominante del suelo, la cual indican que el suelo estuvo sujeto a condiciones de alternancia entre mojado (reducción) y/o secado (oxidación). El moteado de la matriz del suelo se describió en términos de abundancia, tamaño, contraste, límite y color (SENA, 2013).

E. Determinación de la consistencia del suelo

La prueba se realizó cuando en un suelo saturado y seco, donde primero se determinó la adhesividad, que es la cualidad que tienen los materiales

del suelo de adherirse a otros objetos, después se determinó la plasticidad, que es la cualidad por la cual el material edáfico cambia continuamente de forma, pero no de volumen, bajo la acción de una presión constante, y se mantuvo dicha forma al desaparecer la presión (FAO, 2019).

3.5.2. Determinación de las propiedades químicas del suelo

A. Determinación del Cobre

Se analizó el contenido de cobre utilizando el método de Mehlich donde, se pesó 5 gr del suelo y se agregó 20 mL de (H_2COOH 0.2 mol/L + NH_4NO_3 0.25 mol/L + NH_4F 0,015 mol/L + HNO_3 0,015 mol/L + EDTA 0,001 mol/L a pH 2.5), seguidamente se agitó por 5 minutos y posteriormente se filtró por gravedad usando papel filtro Whatman N° 42, y finalmente se realizó las lecturas y así obtener las concentraciones de cobre con el espectrómetro de absorción atómica (BENT JONES, 1991; MEHLICH, 1984).

B. Determinación del Plomo (Pb) y Cadmio (Cd)

Se determinó del contenido total de metales traza de Plomo (Pb) y Cadmio (Cd) por el método EDTA a un 0.05M de pH 7, donde se pesó 200 mg del suelo, las cuales se digirieron por microondas luego de agregó 1.5 mL de HNO_3 al 65 %, y 4.5 mL HCl al 37 %, luego las muestras digeridas se trasladaron a matraces de 10 mL con agua destilada que luego fueron filtradas. Finalmente se analizó por Espectrometría de Absorción Atómica con llama (AAS), las curvas de calibración de cada elemento y se prepararon diluciones de un multiestandar de 1000 ± 10 mg/L, en HNO_3 al 1M. Este método se basa en la suposición que

los iones asociados a algunos componentes del suelo pueden ser desplazados de los puntos de adsorción por la presencia de iones competitivos en la solución extractante (KENNEDY *et al.*, 1997).

C. Determinación del petróleo

Se pesó 5 gr de suelos en la balanza analítica y se puso los suelos dentro de los papeles filtros N° 41, seguido se puso dentro del Dedal del Soxhlet para su lavado de los aceites y grasas, luego se utilizó como solvente orgánico el éter de petróleo, la cual en cada matraz de bola se le añadió 150 mL de combustible señalado, después se procedió a prender cada horno de la manta de calentamiento del dispositivo del Soxhlet, a la vez se abrió la llave del agua para ser trasladado al flujo de agua con el fin de poder estabilizar la temperatura del dispositivo de Soxhlet, seguido se esperó la operatividad del dispositivo de Soxhlet por un tiempo de 8 horas, después del tiempo se dejó de operar el dispositivo, seguido se sometió a una estufa a 120 °C durante 4 horas los matraces de bola que contenían los solventes orgánicos, luego se tomó los pesos de las muestras de suelos con el papel filtro y los matraces de bola que contenían los solventes orgánicos, seguido se procedió a determinar la concentración del petróleo refinado por el método gravimétrico (US EPA 821-B94-004, 1995; EPA 3540C ,1996).

Cálculos

La diferencia en peso corresponde al contenido total de HTPs. Para hacer el cálculo de concentración de petróleo refinado provenientes de la

muestra, se debe considerar la cantidad de suelo que se pesó para la extracción, así como la humedad de la muestra. El resultado debe expresarse en mg de HTP/kg de suelo seco, y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{HTPs (mg/kg de s.s.)} = (\text{RB} - \text{RA}) * (\text{FC}) / (\text{P} * \text{FH}).$$

Donde:

HTPs (mg/kg de s.s.) = Hidrocarburos totales del petróleo en
mg/kg de suelo seco.

RA= peso (mg) del recipiente vacío a peso constante.

RB = peso (mg) del recipiente con el extracto orgánico concentrado.

P = cantidad de suelo extraído (g).

FH = factor de corrección de humedad (1-(% humedad/100)).

FC = factor de corrección para transformar a kg de s.s. = 1 000.

D. Determinación del Boro

Se pesó 10 g de suelo en tubos de plásticos de 50mL con tapa rosca, seguido se añadió 20 mL de agua destilada y se tapó el tubo y se agito vigorosamente, luego se colocó el tubo en baño maria a 100 °C durante 15 minutos, seguido se filtró la suspensión por succión en frascos de plásticos, luego de ese extracto se extrajo 2 mL de ello, luego se añadió 4 mL de la solución buffer y 2 mL del reactivo de color, se agitó vigorosamente y se dejó 45 minutos, seguido se calibró el espectrofotómetro con el que se leyó la concentración o absorbancia con los patrones (0 ppm, 0.2 ppm, 0.4 ppm, 0.6 ppm, 0.8 ppm y 1

ppm) usando una longitud de onda de 430 nm, luego se realizó las lecturas y se calculó la concentración de boro en el suelo (BERGER y TRUOG, 1939).

G) Determinación de la Acidez intercambiable (Al⁺ e H⁺)

Se transfirió 50 mL del extracto obtenido con KCl 1 M a un Erlenmeyer de 125 mL y se agregó 3 gotas de fenolftaleína y se tituló con Na(OH) 0.05 M hasta la aparición de un color rosado pálido permanente, se anotó los mL de Na(OH) gastados en la titulación. Después de la titulación, se agregó una gota de HCl 0.01 M para que el color rosado desaparezca y se agregó 10 mL de NaF 1 M y se tituló con HCl 0.05 M hasta que el color desaparezca otra vez por más de un minuto, y determinó las concentraciones en el espectrofotómetro de absorción atómica la concentración de los Al⁺ e H⁺ y se operó en los siguientes cálculos (COLERNAN *et al.*, 1959; YUAN, 1959).

Cálculos

La acidez y el aluminio Intercambiable se expresan en m_{eq} de suelo:

$$\begin{aligned} \text{Acidez Intercambiable} &= \text{mL Na(OH)} * N \text{ Na(OH)} * \text{vol extracto/vol} \\ &\quad \text{alícuota} * 100/\text{peso de la muestra.} \\ &= \text{mL Na(OH)} * 0.05 * 100/50 * 100/10 \\ &= \text{mL Na(OH)} * 1 = m_{\text{eq}} \text{ de suelo.} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aluminio Intercambiable} &= \text{mL HCl} * N \text{ HCl} * \text{vol extracto/vol alícuota} \\ &\quad \text{de la muestra.} \\ &= \text{mL HCl} * 0.05 * 100/50 * 100/10. \\ &= \text{mL HCl} * 1 = m_{\text{eq}} \text{ de suelo} \end{aligned}$$

H) Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva (CICe)

Se determinó el CICe tomando como la suma de los cationes en el extracto determinado las cuales se expresan en m_{eq} de suelo, usando los resultados obtenidos de los métodos realizados (MCKEAN, 1993).

$$CICe = Ca + Mg + K + Al$$

I) Determinación del Calcio y Magnesio

Se pesó 10 g de suelo, se añadió 50 mL de KCl 1 M y se agitó durante 5 minutos, posteriormente se filtró la mezcla de este extracto se determinará en el espectrofotómetro de absorción atómica la concentración de Ca y Mg (MCKEAN, 1993).

3.5.3. Determinación de las propiedades biológicas del suelo

A. Determinación de la biomasa bacteriana presente en los suelos contaminados con petróleo refinado

Preparación de medios

Para el recuento de bacterias se utilizó los siguientes medios:

- Caldo Peptona: Se preparó 100 mL de agua destilada con 0.1 g del agar peptona.

- Agar Plate Count: Se preparó 200 mL de agua destilada con 4.5 g del agar Plate Count.
- Agar Actinomyces: Se preparó 200 mL de agua destilada con 4.4 g del agar Actinomyces.
- Agar Sabouraud: Se preparó 200 mL de agua destilada con 13 g del agar Sabouraud.

Los matraces que contienen los medios de cultivos se agitaron y se llevaron al baño maria para una disolución total, luego se llevaron a esterilizar al autoclave a 15 psi de presión, se dejó enfriar hasta 45 °C para servir en placas. Para el recuento de microorganismos se realizó, el método de recuento en placa, para ello se preparó dos matraces conteniendo en cada uno 90 mL de caldo peptona al 1 %, seguido se pesó 10 g de suelo y se diluirá en los 90 mL de caldos peptonas y se agitó, luego se filtró después, y se retiró 10mL de los caldos peptonas con una pipeta a los 3 tubos de ensayos respectivamente, donde se aplicó el método de diluciones seriadas , las cuales son (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) seguido se adicionó a su respectivo matraz con caldo peptona donde se homogenizó el caldo peptona, seguido se aplicó el método de placa vertida , para el cual se retiró 1 mL de la última dilución (10^{-3}), y se vertió en una placa petri vacía y se esterilizó seguido se agregó 10mL de agar Plate Count, más un 1 g del agar Manitol Salado, Agar Sabouraud y el agar Actinomyces y se dejó solidificar por unos 5 minutos, seguido se llevó las placas a la estufa a 37 °C por 48 horas (Véase Figura 13). Después de este tiempo se pudo realizar el conteo de microorganismos utilizando el contador de colonias manual.

La fórmula para el conteo de microorganismos (M.O) es la siguiente:

$$\text{M.O} = \text{N}^{\circ} \text{ colonias} \times \text{Inóculo de siembra} \times \text{Factor de dilución}$$

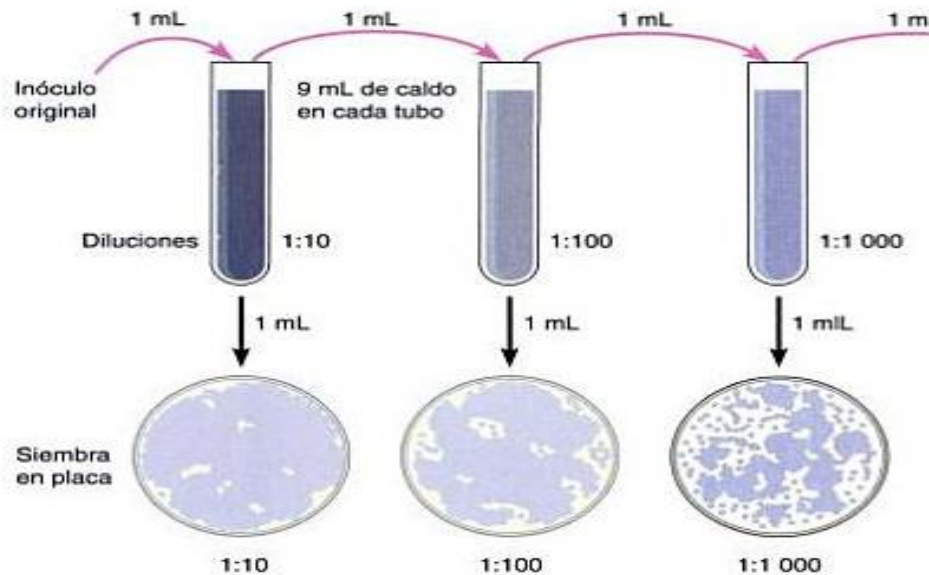


Figura 13. Cálculo del número de microorganismos por el método de diluciones seriadas (TÓRTORA, 2007).

3.5.4. Aislamiento de bacterias del suelo contaminado con petróleo

El aislamiento de los microorganismos del mismo suelo nos permitió tener la población microbiana presente en este para su posterior selección (ALTAMIRANO y POZZO, 2000).

Procedimiento:

- Se pesó 10 g de suelo en la balanza digital.
- Seguido se le añadió a un matraz con agua destilada y Caldo Peptona al 0.1 % (a 100 mL del total del matraz).

- De esta muestra se filtró, y del filtrado se vertió 1 mL de la muestra y se le añadió al primer diluyente (10^{-1}) que contiene 9 mL de agua destilada con caldo peptona al 0.1 %.
- De esta dilución se vertió 1 mL para agregar a otro diluyente y se volvió a repetir esta acción dos veces más (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}).
- Del último diluyente se extrajo una alícuota de 0.25 mL en cual se vertió en una placa Petri con los medios agares que son: M₇₇, CLED, MCCONKEY y MANITOL SALADO, seguido se incubó de 24-48h entre 37 °C y temperatura ambiente.

3.5.5. Identificación de géneros microbianos en suelos contaminados con petróleo refinado

A. Preparación de medios de cultivo

Los medios necesarios para el crecimiento de bacterias son los siguientes y se prepararon de esta manera:

- Agar CLED: Se preparó 200 mL de agua destilada con 6.6 g del agar Cled.
- Agar McConkey: Se preparó 200 mL de agua destilada con 10.3 g del agar McConkey.
- Agar M₇₇: Se preparó 200 mL de agua destilada con 6.8 g del agar M₇₇.
- Agar Manitol salado: Se preparó 200 mL de agua destilada con 22.22 g del agar Manitol salado.

Todos los matraces se mezclaron bien y se llevó al baño maría para que hiervan hasta la disolución total, luego se llevó a esterilizar al autoclave a 15 psi de presión por 15 minutos, y se dejó enfriar hasta 45 °C para servir a las placas petris.

Se pesó 10 g del suelo, se adicionó en el caldo peptona al 0.1 % luego se filtró y se sacó 10 mL para las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , de la última dilución (10^{-3}), y se sembró en el agar M₇₇, Agar Manitol salado, Agar Cled, Agar Macconkey y Agar Cetrimide, y se incubó a una temperatura de 37 °C y el agar M₇₇, se incubó a una temperatura ambiente por 24-48 horas (LOPEZ, 1990).

B. Coloración bacteriana

Se tomó una pequeña muestra de la cepa y se diluyó en el portaobjetos. Posteriormente se fijó la muestra al calor flameándola en el mechero, cuidando no quemar la muestra (LOPEZ, 1990).

- Se puso los portaobjetos sobre un soporte, se vertió a la muestra con cristal violeta y se esperó a que transcurra 1 minuto, seguido se escurrió y se enjuagó las muestras de los portaobjetos.
- Luego se dispersó a la muestra con solución de lugol y se esperó a que transcurra 1 minuto y se escurrió y se enjuagó las muestras.
- Seguido se dispersó a la muestra alcohol acetona y se esperó que transcurran 5 segundos y se escurrió y se enjuagó en movimiento de vaivén.

- Luego se vertió a la muestra con safranina, y se esperó que transcurra 1 minuto, se escurrió y se enjuagó las muestras.
- Se dejó secar las muestras y se agregó una gota de aceite de inmersión y seguido se observó en el microscopio a 100x.

C. Prueba de Diferenciación Bioquímica

De todas las colonias que se aisló en el medio M₇₇, Cled, MacConkey, Cetrimide, Muller Hinton y Manitol Salado; se cogió una sola colonia con el ansa de siembra, se sembró en todos con medios de cultivo diferenciales, y se dejó incubar a 37 °C por 48 horas (LOPEZ, 1990).

Después se incubó las placas Petri para el crecimiento de bacterias, se realizaron las pruebas bioquímicas siguientes:

Indol: Se vertió aproximadamente 9 mL de caldo peptona al 0.1 % a un tubo de ensayo, se realizó la siembra de bacterias con el aza de siembra por el método de enjuague. Se incubó por 48 horas, para la determinación se usó el reactivo de KOVAC, y se vertió de 2 – 3 gotas.

Rojo de metilo: Se utilizó el caldo rojo de metilo y voges-proskauer (RM-VP), aproximadamente 9 mL en cada tubo de ensayo, se sembró mediante el método de enjuague; se incubó por 48 horas y como reactivo se adicionó el rojo de metilo de 2 - 3 gotas.

Voges-Proskauer (VP): Se vertió en el tubo de ensayo el caldo RMVP, se sembró mediante el método de enjuague y se incubó por 48 horas; como reactivo se utilizó hidróxido de sodio Na(OH) al 4 % de 2 - 3 gotas y se adicionó el reactivo de alfa naftol de 2 – 3 gotas.

TSI: Se vertió el agar a 45 °C hasta la tercera parte de los tubos de ensayo, se dejó enfriar en pico de flauta, luego se sembró con puntura y estrías, se incubó a 37 °C por 48 horas; el tipo de reacción positivo o negativo se conoce por el cambio de color.

LIA: Se vertió el agar a los tubos de ensayo a una temperatura de 45 °C y se dejó enfriar en pico de flauta, y se procedió a sembrar la colonia de bacteria seleccionada mediante el método de puntura y estrías; la reacción se muestra mediante el cambio de color.

Citrato de Simmons: Se vertió el agar en los tubos de ensayo y se dejó enfriar en modo inclinado para luego sembrar por el método de estrías. Pasada las 48 horas de incubación, el cambio a color azul indicó la reacción positiva o negativa.

SIM: Se vertió el agar en los tubos de ensayo y se dejó enfriar para luego sembrarlo por el método de Puntúa. Pasada las 48 horas de incubación, para la determinación se usó el reactivo de K(OH) (4 %), y se vertió de 2 – 3 gotas.

Caldo Malonato: Se vertió el caldo en los tubos de ensayo y se realizó la siembra por el método de enjuague, después se incubó por 48 horas se observó si hubo o no reacción, es positivo si cambia a color azul.

Úrea: Se vertió el agar en tubos de ensayo, y se sembró la colonia de bacterias por el método de puntura, al cabo de las 48 horas el cambio de color expresó si hubo reacción positiva.

Y se leyó los resultados, y agregó los reactivos de confirmación a los tubos que corresponda y se observó el cambio de color.

Prueba de indol: Se agregó 3 o más gotas del reactivo de KOVAC al tubo con caldo peptona. Si da un anillo rojo es positivo a indol (metabolitos proteicos), anillo anaranjado es negativo el indol.

Prueba de rojo de metilo (RM): Se agregó 2 a 3 gotas de colorante rojo de metilo a uno de los tubos con caldo MR-VP, la cual expresa el color rojo si es positivo a rojo de metilo, si da color anaranjado es negativo a rojo de metilo.

Prueba de voges-proskauer (VP): Al otro tubo con caldo MR-VP se agregó 2 a 3 gotas de K(OH) al 4 % luego se añadió gotas de reactivo alfa naftol se esperó entre 10 a 20 minutos. Una coloración rosada nos indica que es positivo el VP, y si la coloración es amarilla nos indica que es negativo el VP.

Luego para las otras pruebas de citrato TSI, LIA, Urea, se observó el viraje de color de cada prueba, y se observó con una tabla de pruebas bioquímicas la especie o género de cada microorganismo.

Prueba TSI: Degradación de los tres azúcares (Lactosa, Glucosa y Sacarosa).

K= Alcalino

A= Acido

K/A: La bacteria ha degradado sacarosa y glucosa.

A/A: La bacteria ha consumido los tres azúcares + H₂S + gas.

A/K: bacterias anaerobias.

R/K: No hay reacción.

Prueba de LIA (Lisina descarboxilasa): Se observó la desaminación descarboxilación.

K= Alcalino

A= Acido

K/K: No reacción.

K/A: Diseminación de lisina.

A/K: Diseminación de lisina.

A/A: Diseminación de lisina +H₂S+gas.

Prueba de Citrato de Simón: Cuando la bacteria utilice como fuente de carbono al citrato el medio se alcaliniza y sube su pH a 6.8 – 7.4 y da un color azul (positivo) y verde (negativo).

Prueba caldo Malonato: Cuando la bacteria utilice como una única fuente de carbono el malonato de sodio este medio se alcaliniza sobre su pH a 6.8 – 7.4 y da un color azul (positivo) y verde (negativo).

Prueba de Urea: Cuando la bacteria utilice como una única fuente de carbono la ureasa este medio se alcaliniza sobre su pH a 6.8 – 6.9 fucsia con un pH 7.8 (positivo) y si da un color rosado pálido (negativo).

Prueba SIM: Se adicionó 2 - 3 gotas de reactivo K(OH) 4 %, si la bacteria utiliza como fuente de carbono da un anillo color rojo indol (positivo) y si no reacciona (negativo).

3.5.6. Selección de microorganismos degradadores del petróleo refinado

La selección de los microorganismos degradadores de hidrocarburos nos permitirá identificar a aquellos microorganismos que son capaces de degradar el hidrocarburo y serán utilizados en esta investigación (ALTAMIRANO y POZZO, 2000).

Procedimiento:

- Los microorganismos que se desarrollaron en el medio BHI (caldo cerebro corazón) se los repicará en caldos peptona 1 %,
- Después se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente.

- Luego se sembraron sobre medio Mínimo de Sales Minerales (MMSM) conteniendo el suelo contaminado con petróleo refinado en varias concentraciones (0.25 %, 0.50 %, 0.75 %, 1.00 %); estos se incubarán a temperatura ambiente por 48 horas.
- Los microorganismos desarrollados serán los que se acondicionaron a los tratamientos de degradación del petróleo refinado en el suelo muestreado.
- Luego se mantuvieron en cepas individualmente en el Agar Muller Hinton hasta su uso.

3.5.7. Selección/elección de organismos para uso biotecnológico

A. Fase de selección

- Se extrajo una muestra de suelos a analizar.
- Se pesó 10 g del suelo extraído
- Se preparó 100 mL de Caldo peptona al 0.1 %, y se dejó reposar por 20 a 30 minutos y se añadió 10 g del suelo extraído.
- Se filtró la mezcla del caldo peptona al 0.1 % con los 10 g del suelo extraído, en un matraz.
- Seguido se extrajo 10mL del medio filtrado y se le añadió al 90mL del BHI (10^1) y se dejó incubar por 24 horas entre 20 a 37 °C.
- Luego de las 24 horas de ser incubado, se extrajo 1 mL del matraz incubado y se vertió en un tubo de ensayo con 8 mL de caldo peptona al 0.1% (10^1).

- Se extrajo 1 mL del tubo de ensayo con 8 mL del caldo peptona y la incubación y se repitió el mismo procedimiento hasta el 10^2 y 10^3 .
- Plaquear con agares M₇₇, MacConkey, Cled, Muller Hinton y Manitol Salado, para cada muestra del suelo.
- De la última solución (10^3), se sembró en las placas que contienen los agares M₇₇, MacConkey, Cled, Muller Hinton y Manitol Salado y se dejó incubar por 24 o 48 horas entre 20 a 37 °C.
- Luego de 24 o 48 horas de incubación de los agares, se pasó a sembrar en un matraz con caldo BHI, todas las colonias de microorganismos encontradas en dichas placas.
- Luego se extrajo 10 mL del BHI incubado con los microorganismos y se le vertió en 190 mL del agar Muller Hinton, seguido se llevó las muestras a incubar por 24 o 48 horas entre 20 a 37 °C, para su fase de elección (LÓPEZ, 2006).

B. Fase de elección

- Realizado la fase de selección, se preparó el medio mínimo de sales de Davis (MMS) en un matraz de 1L.
- Seguido se dividió en 4 matraces, 200mL del medio mínimo de sales de Davis (MMS) en cada matraz.
- Se añadió 4 concentraciones diferentes del petróleo refinado a cada matraz con 200mL del medio mínimo de sales de Davis (MMS), dichas concentraciones son las siguientes: 0.25 % (0.50 mL), 0.50 % (1.0 mL), 0.75 % (1.50 mL) y 1.00 % (2.00 mL),

respecto de cada matraz con el medio mínimo de sales de Davis (MMS).

- Seguido se plaqueó y se realizó 3 repeticiones por cada concentración del petróleo refinado y se sembró en cada placa con diferente concentración del hidrocarburo (petróleo refinado) y se dejó incubarlo por 24 o 48 horas entre 20 a 37 °C en placas invertidas.
- Luego de la incubación de 24 o 48 horas entre 20 a 37 °C, se presenció el crecimiento de los microorganismos resistentes a dichas concentraciones del hidrocarburo (petróleo refinado).
- Se seleccionó los microorganismos que crecieron en mayor concentración del hidrocarburo (petróleo refinado) para luego replicarlos en el agar Muller Hinton y se incubó en tubos de ensayos por 24 o 48 horas entre 20 a 37 °C.
- Luego se incubó por 24 o 48 horas entre 20 a 37 °C, se conservó en refrigeración (4 °C a 8 °C), hasta su utilización (LÓPEZ, 2006).

3.6. Preparación de biorreactores air lift

Los biorreactores tipo air lift que se utilizaron para este trabajo fueron preparados en el laboratorio, constituidos por una cámara de cultivo cilíndrica de vidrio de 100 mm de diámetro de 200 mm de altura, tubo deflector o de distribución central de 80 por 28 mm y frascos con solución saturada de NaCl como filtros para aire, la fuente de aeración fue una bomba de aire doble

salida (ELITE 802) la que proporcionó 1,100 mL/min O₂ (LÓPEZ, 1998; MIRANDA *et al.*, 2006).

La cámara de cultivo y tubo deflector o de distribución de los biorreactores se esterilizaron al vapor de agua, utilizando la autoclave a 121 °C a 151 bs/pulg² por 15 minutos; y se esterilizaron por sumersión en solución alcohol-ácida al 1 % (etanol - HCl) los accesorios del biorreactor como son la cubierta superior (material micro poroso), válvulas de control de entrada/salida de aire y conectores de flujo de aire (LÓPEZ, 1998; MIRANDA *et al.*, 2006).

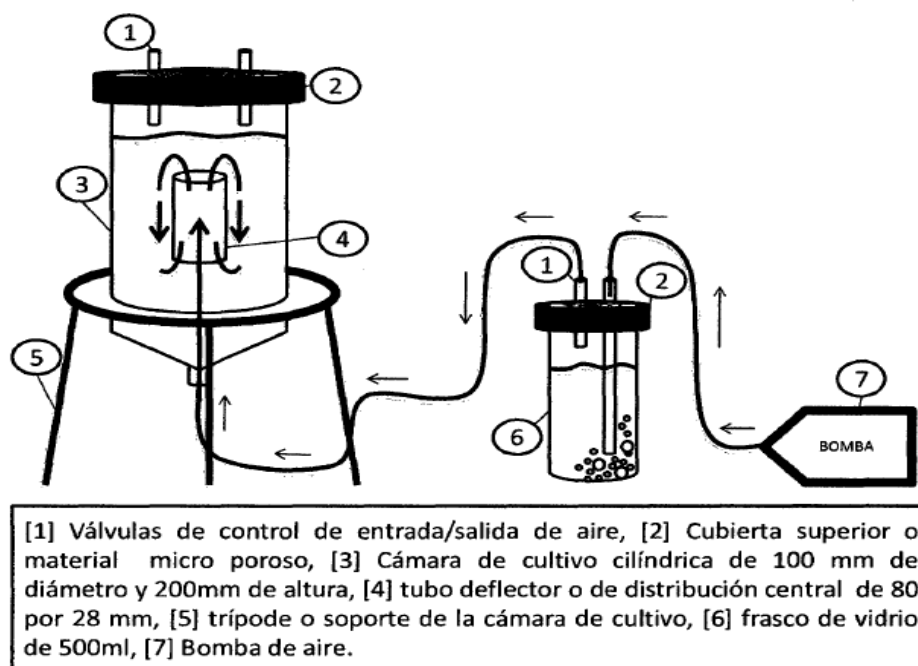


Figura 14. Instalación del biorreactor Air Lift

3.6.1. Operación en los biorreactores

Las bacterias seleccionadas y refrigeradas, fueron reactivadas en nuevos medios de BHI constituyéndose en inóculos para los biorreactores tipo

Air Lift en una proporción de 8 % u 80 mL del BHI respecto al volumen total de los biorreactores (1000 mL), añadido a cada biorreactor 1 mL de glucosa, con una variabilidad de volúmenes de las dosis del petróleo a concentraciones de 0.25 %, 0.50 %, 0.75 % y 1.00 %; y diferentes volúmenes del Medio Mínimo de Sales Minerales de Davis (MMSD). La operación en batch se inició al poner en funcionamiento las bombas aireadoras con un tiempo de operación de 15 días, cuyas mediciones de los parámetros medidos en los biorreactores son: Temperatura, Oxígeno Disuelto, pH y densidad microbiana; donde las mediciones de dichos parámetros fueron en los días 1er, 8vo y 15vo día (SCRAAG, 2002).

3.7. Diseño de investigación

A. Diseño

Esta investigación es de un diseño experimental, debido a que se manipuló la variable independiente (Petróleo refinado) para observar la variable dependiente (Microorganismos).

B. Población y muestra

Unidad de análisis

La unidad de análisis es el suelo de una refinería contaminado con petróleo refinado.

Población

La población son todos los microorganismos del suelo contaminado con petróleo refinado (Microorganismos viables, actinomicetos y hongos).

Muestra

La muestra que se usó muestras de 10 g del suelo contaminado con petróleo haciéndose 3 repeticiones, donde fueron sometidas a un análisis en los laboratorios seguido a una biorremediación con los microorganismos encontrados.

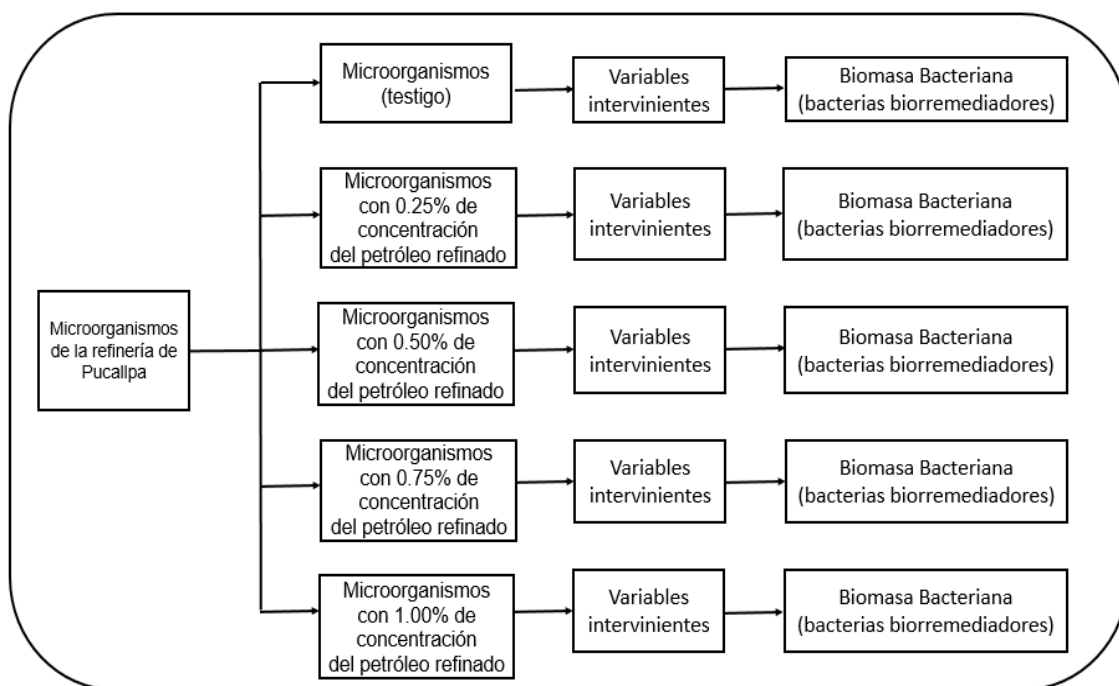


Figura 15. Diseño experimental

C. Variables

Cuadro 24. Variables y operación

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADORES	ESCALA
Dependencia	Microorganismos biorremediadores	Los microorganismos, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, poseen la capacidad de utilizar diferentes compuestos tóxicos como fuente de carbono, sin embargo, su densidad poblacional es limitada en sitios no contaminados y se incrementa en ambientes impactados por un contaminante (NÚÑEZ, 2003; MADIGAN <i>et al.</i> , 2004).	Se realizará análisis biológicos como la densidad microbiana y la selección de microorganismos con capacidad degradativa del petróleo.	Concentración Eficiencia	Biomasa g/mL
Independencia	Petróleo refinado	Se define como una mezcla heterogénea de compuestos orgánicos, principalmente hidrocarburos insolubles en agua y su fórmula general es C_nH^{2n+2} (OKOH, 2006; CANDO, 2011). También contiene elementos que constituyen menos del 3 % (v/v) como el nitrógeno, azufre y oxígeno, y menos del 1 % (v/v) de elementos traza fósforo y metales pesados vanadio y níquel (OKOH, 2006).	Se realizará el análisis del petróleo refinado por el método de gravimetría a la muestra del suelo contaminado con petróleo refinado.	Concentración	Aceites y grasas mL/g de suelo

3.7.1. Ajuste estadístico

Para los análisis de los datos se determinó si la concentración de petróleo y la concentración de microorganismos, se realizó la distribución normal (DN) y homogeneidad de varianzas, luego se realizó el análisis de varianza (ANVA) y la prueba Tukey para determinar diferencias significativas de la degradación del petróleo refinado en relación de los microorganismos entre medias de tratamientos, para nivel de significación de 5 %, las cuales son: Microorganismos (testigo), Microorganismos + 0.25 % petróleo refinado, Microorganismos 0.50 % petróleo refinado, Microorganismos 0.75 % petróleo refinado y Microorganismos 1.00 % petróleo refinado (Véase Anexo A)

IV. RESULTADOS

4.1. Determinación de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo

4.1.1. Determinación de las propiedades físicas en el suelo

En el cuadro 25, se observan las propiedades físicas del suelo en estudio cuyos resultados de los análisis están detallados.

Cuadro 25. Propiedades físicas del suelo

Análisis Mecánico						
Muestra	Arena (%)	Arcilla (%)	Limo (%)	Textura	Permeabilidad (cm/Hora)	Conductividad Hidráulica (cm/Hora)
Muestra 1	26	45	29	Arcilloso	0.89	0.51

Cuadro 25. Propiedades físicas del suelo (continuación...)

Color					
Gradiente Munsell	Código de color del suelo Munsell	Descripción del color del suelo Munsell	Horizonte	Profundidad	Comentario
12.5	2.5YR 4/8	Rojo	A _g	0 - 5 cm	"g" moteado (abigarrado) por oxidación/reducción del Fe. Manchas de colores pardos/rojos y gris/verde. Hidromorfia parcial. B _g , C _g y más raramente A _g .

Cuadro 25. Propiedades físicas del suelo (continuación...)

Moteados					
Clasificación de la abundancia de moteados			Clasificación del contraste de los moteados		
Código	Abundancia de moteados	%	Código	Clasificación del contraste de los moteados	Descripción
A	Abundante	> 40	D	Distinto	Aunque no tan impresionante, los moteados son bien vistos. El matiz, croma y valor de la matriz son fácilmente distinguible de los moteados. Pueden variar por más de 2.5 unidades de matiz o muchas unidades en croma o valor.

Cuadro 25. Propiedades físicas del suelo (continuación...)

Moteados					
Clasificación del tamaño de los moteados			Clasificación del límite entre el moteado y la matriz		
Código	Clasificación del tamaño de los moteados	mm	Código	Clasificación del límite entre el moteado y la matriz	mm
V	Muy Fino	< 2	C	Claro	0.5 - 2

Cuadro 25. Propiedades físicas del suelo (continuación...)

Consistencia					
Consistencia en seco			Consistencia en húmedo		
Códigos	Consistencia del suelo en seco	Descripción	Códigos	Consistencia de la masa del suelo húmedo	Descripción
VHA	Muy duro	Muy resistente a la presión; puede disgregarse en las manos solo con dificultad.	VFR	Muy friable	El material de suelo se aplasta bajo presión leve, pero es coherente cuando se lo presiona todo al mismo tiempo.

Cuadro 25. Propiedades físicas del suelo (continuación...)

Consistencia en seco		
Códigos	Clasificación de la plasticidad del suelo	Descripción
SPL	Ligeramente Suave	Se forma el cordón pero se rompe inmediatamente si se le curva en forma de aro, la masa del suelo se deforma por una muy ligera fuerza.

4.1.2. Determinación de las propiedades químicas en el suelo

En el cuadro 26, se observan las propiedades químicas del suelo en estudio con los siguientes análisis realizados en la muestra del suelo sin contaminar.

A. Propiedades químicas del suelo sin contaminar

Cuadro 26. Propiedades químicas del suelo sin contaminar

Muestra	pH	M.O	N	P	K	Ca	Mg
	1:1	%	%	ppm	ppm	Cmol(+)/kg	Cmol(+)/kg
Muestra 1	4.90	1.14	0.06	5.12	85.96	2.94	2.91

Cuadro 26. Propiedades químicas del suelo sin contaminar (continuación...)

Muestra	Al	H+	CICe	%	%	%	HTP
	(Cmol(+)/kg)	(Cmol(+)/kg)	(Cmol(+)/kg)	Base Camb.	Ac. Camb.	Sat. Camb.	mg/kg
Muestra 1	11.86	3.95	21.66	27.00	73.00	54.76	1180

B. Propiedades químicas del suelo contaminado

En el cuadro 27, se observan las propiedades químicas del suelo en estudio con los siguientes análisis realizados en la muestra del suelo contaminado.

Cuadro 27. Propiedades químicas del suelo contaminado

Muestra	pH	M.O	N	P	K	Ca	Mg
	1:1	%	%	ppm	ppm	Cmol(+)/kg	Cmol(+)/kg
Muestra 1	3.92	1.66	0.08	2.55	32.34	3.95	0.68

Cuadro 27. Propiedades químicas del suelo contaminado (continuación...)

Muestra	Al	H+	CICe	%	%	%
	(Cmol(+)/kg)	(Cmol(+)/kg)	(Cmol(+)/kg)	Base Camb.	Ac. Camb.	Sat. Camb.
Muestra 1	10.2	0.5	15.33	30.18	69.82	66.56

Cuadro 27. Propiedades químicas del suelo contaminado (continuación...)

Muestra	Cd	Pb	Cu	B	Mn	Fe	HTP	Zn
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	mg/ kg	ppm
Muestra 1	0.48	2.4	1.28	2.22	5.70	115.64	1254	2.78

4.1.3. Determinación de las propiedades biológicas en el suelo

A. Concentración bacteriana presente en el suelo

En el cuadro 28, se observa la concentración celular de microorganismos en bacteria en la primera y segunda muestra y se promedió para la obtención de un único resultado en las tres repeticiones que se obtuvo.

Cuadro 28. Concentración de microorganismos en bacterias en el suelo.

Zona de muestreo	Nº de microorganismos 1º muestra
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (1ra repetición)	531 x 10 ³ UFC
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (2da repetición)	946 x 10 ³ UFC
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (3ra repetición)	698 x 10 ³ UFC

En la Figura 16, se observa mayor densidad microbiana de la Refinería Maple Gas Corporation del Perú S.R.L. en la segunda repetición,

donde se obtuvo una concentración de bacterias de 946×10^3 UFC con mayor concentración y el de menor concentración fue en la primera repetición con 531×10^3 UFC.

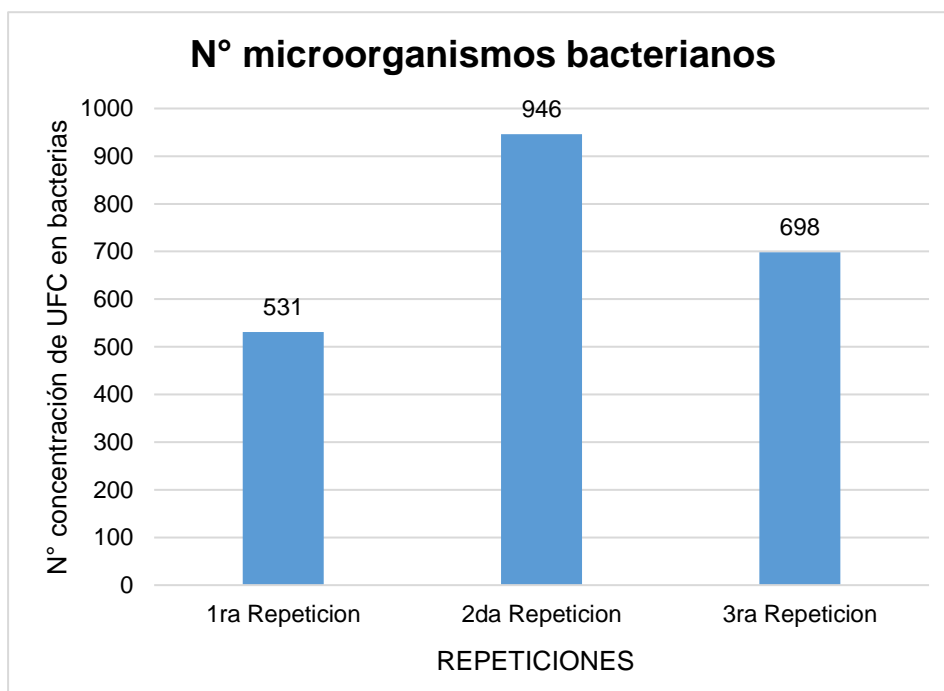


Figura 16. Concentraciones bacterianas en el suelo de la refinera

B. Concentración de Actinomicetos en el suelo

En el cuadro 29, se observa la concentración de Actinomicetos en la muestra del suelo.

Cuadro 29. Concentración de Actinomicetos en el suelo

Zona de muestreo	Nº de Actinomicetos 1º muestra
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (1ra repetición)	469 x 10 ³ UFC
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (2da repetición)	706 x 10 ³ UFC
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (3ra repetición)	458 x 10 ³ UFC

En la Figura 17, se observa las concentraciones de actinomicetos de la Refinería Maple Gas Corporation del Perú S.R.L., donde la mayor concentración es de 706 x 10³ UFC en la segunda repetición y de menor concentración es la tercera repetición con 458 x 10³ UFC.

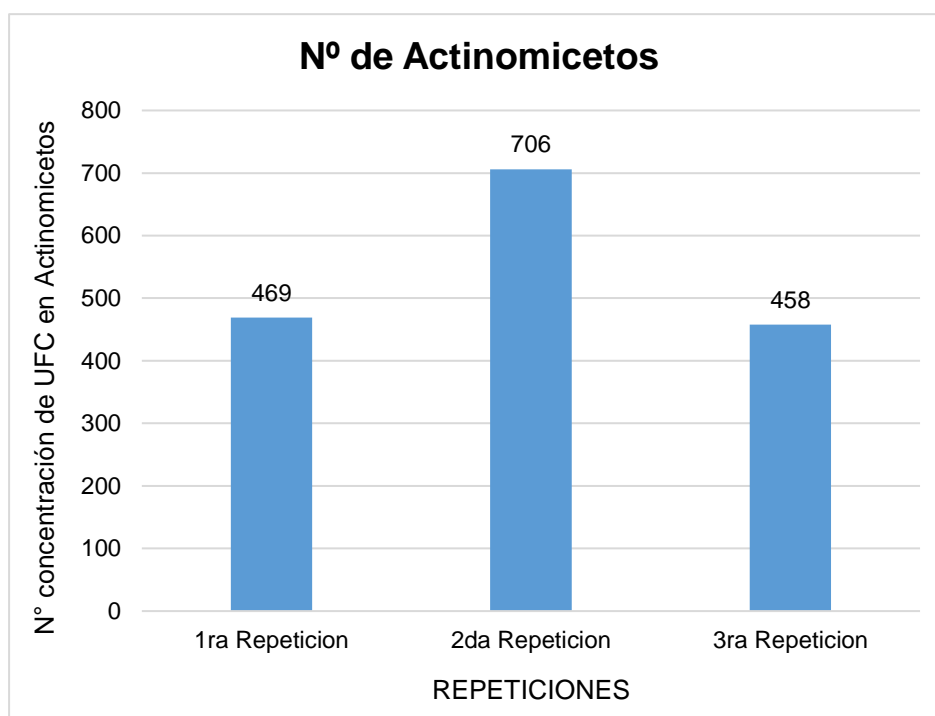


Figura 17. Concentraciones de Actinomicetos en el suelo de la refinería

4.2. Identificación de los géneros de las bacterias presentes en el suelo

4.2.1. Reconociendo de las bacterias

En el cuadro 30, muestra las especies identificadas en el primer y segundo muestreo en suelos contaminados con hidrocarburo.

Cuadro 30. Reconocimiento de bacterias para el primer muestreo

Zona de muestreo	Primer Muestreo
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (1ra repetición)	<i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Enterobacter hafniae</i> <i>Proteus mogani</i>
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (2da repetición)	<i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Enterobacter hafniae</i> <i>Serratia rubidaea</i>
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (3ra repetición)	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Salmonella Sp.</i>

4.3. Selección y elección de las bacterias con capacidad degradativa del hidrocarburo en el suelo

4.3.1. Bacterias con capacidad degradativa del hidrocarburo a diferentes concentraciones del petróleo en la primera repetición

En el cuadro 31, se observa las bacterias con capacidad degradativa del hidrocarburo concentraciones del 0.25 %, 0.50 %, 0.75 %, 1.00 % del petróleo refinado en la primera repetición.

Cuadro 31. Bacterias identificadas con capacidad degradativa del hidrocarburo.

GÉNEROS	ESPECIES
<i>Enterobacter</i>	<i>agglomerans</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>hafniae</i>
<i>Proteus</i>	<i>mogani</i>

A la concentración del 0.25 % del petróleo refinado con el suelo en el agar Mínimo de Sales Minerales de Davis, se obtuvo un crecimiento bacteriano en las 4 repeticiones al 100 %, siendo eficaces las bacterias encontradas en la muestra del suelo de la refinería de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L.

A la concentración del 0.50 % del petróleo refinado con el suelo en el agar Mínimo de Sales Minerales de Davis, se obtuvo un crecimiento bacteriano en las 4 repeticiones al 100 %, siendo eficaces las bacterias encontradas en la muestra del suelo de la refinería de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L.

A la concentración del 0.75 % del petróleo refinado con el suelo en el agar Mínimo de Sales Minerales de Davis, se obtuvo un crecimiento bacteriano en las 4 repeticiones al 100 %, siendo eficaces las bacterias encontradas en la muestra del suelo de la refinería de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L.

A la concentración del 1.00 % del petróleo refinado con el suelo en el agar Mínimo de Sales Minerales de Davis, se obtuvo un crecimiento bacteriano en las 4 repeticiones al 100 %, siendo eficaces las bacterias encontradas en la muestra del suelo de la refinería de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L.

4.3.2. Bacterias con capacidad degradativa del hidrocarburo a diferentes concentraciones del petróleo en la segunda repetición

En el cuadro 32, se observa las bacterias con capacidad degradativa del hidrocarburo concentraciones del 0.25 %, 0.50 %, 0.75 %, 1.00 % del petróleo refinado en la primera repetición.

Cuadro 32. Bacterias identificadas con capacidad degradativa del hidrocarburo.

GÉNEROS	ESPECIES
<i>Enterobacter</i>	<i>agglomerans</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>hafniae</i>
<i>Serratia</i>	<i>rubidaea</i>

A la concentración del 0.25 % del petróleo refinado con el suelo en el agar Mínimo de Sales Minerales de Davis, se obtuvo un crecimiento bacteriano en las 4 repeticiones al 100 %, siendo eficaces las bacterias encontradas en la muestra del suelo de la refinería de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L.

A la concentración del 0.50 % del petróleo refinado con el suelo en el agar Mínimo de Sales Minerales de Davis, se obtuvo un crecimiento bacteriano en las 4 repeticiones al 100 %, siendo eficaces las bacterias encontradas en la muestra del suelo de la refinería de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L.

A la concentración del 0.75 % del petróleo refinado con el suelo en el agar Mínimo de Sales Minerales de Davis, se obtuvo un crecimiento bacteriano en las 4 repeticiones al 100 %, siendo eficaces las bacterias encontradas en la muestra del suelo de la refinería de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L.

A la concentración del 1.00 % del petróleo refinado con el suelo en el agar Mínimo de Sales Minerales de Davis, se obtuvo un crecimiento bacteriano en las 4 repeticiones al 100 %, siendo eficaces las bacterias encontradas en la muestra del suelo de la refinería de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L.

4.3.3. Bacterias con capacidad degradativa del hidrocarburo a diferentes concentraciones del petróleo en la tercera repetición

En el cuadro 33, se observa las bacterias con capacidad degradativa del hidrocarburo concentraciones del 0.25 %, 0.50 %, 0.75 %, 1.00 % del petróleo refinado en la primera repetición.

Cuadro 33. Bacterias identificadas con capacidad degradativa del hidrocarburo.

GÉNEROS	ESPECIES
<i>Enterobacter</i>	<i>agglomeruns</i>
<i>Enterobacter</i>	cloacae
<i>Salmonella</i>	<i>sp.</i>

A la concentración del 0.25 % del petróleo refinado con el suelo en el agar Mínimo de Sales Minerales de Davis, se obtuvo un crecimiento de las bacterias encontradas en la muestra del suelo de la refinería de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L., en las 4 repeticiones.

A la concentración del 0.50 % del petróleo refinado con el suelo en el agar Mínimo de Sales Minerales de Davis, se obtuvo un crecimiento de las bacterias encontradas en la muestra del suelo de la refinería de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L., en las 4 repeticiones.

A la concentración del 0.75 % del petróleo refinado con el suelo en el agar Mínimo de Sales Minerales de Davis, se obtuvo un crecimiento de las bacterias encontradas en la muestra del suelo de la refinería de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L., en las 4 repeticiones.

A la concentración del 1.00 % del petróleo refinado con el suelo en el agar Mínimo de Sales Minerales de Davis, se obtuvo un crecimiento de las bacterias encontradas en la muestra del suelo de la refinería de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L., en las 4 repeticiones.

4.4. Determinación de la eficiencia de la biorremediación de un suelo contaminado con petróleo usando el biorreactor Air Lift.

4.4.1. Determinación de la eficiencia del biorreactor Air Lift

En los cuadros 34, 35 y 36, se registraron las colonias de microorganismos, el crecimiento y decrecimiento de población bacteriana y el cálculo de la eficiencia bacteriana en el proceso de la biorremediación en el cual en el cuadro 34, se observó mayor porcentaje de eficiencia microbiana es en el biorreactor cuatro (B₄) de la primera repetición a una concentración de 1 mL de

petróleo refinado en donde creció la población microbiana y se observó menos porcentaje de eficiencia microbiana es en el biorreactor cuatro (B₄) de la segunda repetición a una concentración de 1 mL de petróleo refinado en donde decreció la mayor cantidad de la población microbiana en operación de los biorreactores.

Cuadro 34. Crecimiento bacteriano en los biorreactores a través del tiempo y su porcentaje de eficiencia bacteriana en la biorremediación del petróleo refinado en la primera repetición.

1RA REPETICIÓN							
Biorreactores	# COLONIAS			% de crecimiento y decrecimiento bacteriano			% Efic. bacteriana
	DIA 1	DIA 8	DIA 15	Día 1 a 8	Día 1 a 15	Día 8 a 15	
B ₀ (testigo)	2728	1630	1217	- 40.249	- 55.389	- 25.337	- 55.389
B ₁ (0.25 mL)	2505	1450	436	- 42.116	- 82.595	- 69.931	- 82.595
B ₂ (0.50 mL)	1908	1350	463	- 29.245	- 75.734	- 65.704	- 75.734
B ₃ (0.75 mL)	493	200	360	- 59.432	- 26.978	+ 80.000	- 26.978
B ₄ (1.00mL)	432	731	491	+ 69.213	+ 13.658	- 32.832	+ 13.658

Cuadro 35. Crecimiento bacteriano en los biorreactores a través del tiempo y su porcentaje de eficiencia bacteriana en la biorremediación del petróleo refinado en la segunda repetición.

2DA REPETICIÓN							
Biorreactores	# COLONIAS			% de crecimiento y decrecimiento bacteriano			% Efic. Bacteriana
	DIA 1	DIA 8	DIA 15	Día 1 a 8	Día 1 a 15	Día 8 a 15	
B ₀ (testigo)	758	583	284	- 23.087	- 62.533	- 51.286	- 62.533
B ₁ (0.25 mL)	985	757	682	- 23.147	- 30.761	- 9.908	- 30.761
B ₂ (0.50 mL)	1386	1066	624	- 23.088	- 54.978	- 41.463	- 54.978
B ₃ (0.75 mL)	926	712	414	- 23.110	- 55.292	- 41.854	- 55.292
B ₄ (1.00mL)	2210	1690	326	- 23.529	- 85.249	- 80.710	- 85.249

Cuadro 36. Crecimiento bacteriano en los biorreactores a través del tiempo y su porcentaje de eficiencia bacteriana en la biorremediación del petróleo refinado en la tercera repetición.

3RA REPETICIÓN							
Biorreactores	# COLONIAS			% de crecimiento y decrecimiento bacteriano			% Efic. bacteriana
	DIA 1	DIA 8	DIA 15	Día 1 a 8	Día 1 a 15	Día 8 a 15	
B ₀ (testigo)	802	616	408	- 23.192	- 49.127	- 33.766	- 49.127
B ₁ (0.25 mL)	726	557	528	- 23.278	- 27.278	- 5.206	- 27.278
B ₂ (0.50 mL)	875	672	700	- 23.200	- 20.000	+ 4.167	- 20.000
B ₃ (0.75 mL)	860	660	687	- 23.256	- 20.116	+ 4.091	- 20.116
B ₄ (1.00 mL)	975	748	946	- 23.282	- 2.974	+ 26.471	- 2.974

4.4.2. Datos obtenidos de los biorreactores en operación y la correlación entre los parámetros medidos

En los cuadros 37, 38, 39 se indican los datos registrados de Temperatura ($^{\circ}$ T), oxígeno disuelto (OD), pH y población microbiana (M.O); obtenidos de la operación de los biorreactores Air Lift con un tiempo de medición de 15 días, de las cuales se midieron en el 1er día, 8vo día y el 15vo día con 3 repeticiones en los biorreactores en operación.

Cuadro 37. Datos obtenidos de la primera repetición en los biorreactores en operación

1RA REPETICIÓN					
BIORREACTORES	DIAS	OD (ppm)	pH	Temperatura ($^{\circ}$C)	Biomasa microbiana (UFC)
B0	DIA 1	1.08	10.03	27.8	2728
B1		0.22	9.42	26.5	2505
B2		0.68	9.13	27.8	1908
B3		0.2	8.51	27.9	493
B4		0.86	9.32	28.4	432
B0	DIA 8	2.78	9.3	28.4	163
B1		0.42	8.61	27.9	145
B2		1.23	8.43	28	35
B3		0.2	8.15	27.6	20
B4		1.36	8.9	27.9	731
B0	DIA 15	3.22	7.96	26.7	1217
B1		0.3	8.11	26.6	436
B2		2.15	8.62	26	463
B3		0.23	7.66	26.9	360
B4		3.12	8.06	26.4	491

Cuadro 38. Datos obtenidos de la segunda repetición en los biorreactores en operación

2DA REPETICIÓN					
BIORREACTORES	DIAS	OD (ppm)	pH	Temperatura (°C)	Biomasa microbiana (UFC)
B0		0.46	8.14	33.7	758
B1		0.63	8.14	29.2	985
B2	DIA 1	0.44	8.14	27.4	1386
B3		0.54	8.06	27.7	926
B4		0.43	8.04	27.6	2210
B0		2.43	8.76	29.9	583
B1		3.62	9.02	30.3	757
B2	DIA 8	3.4	8.83	30.5	1066
B3		2.43	8.92	29.9	712
B4		2.43	8.9	30.7	1699
B0		3.27	9.22	30.2	284
B1		3.85	9.49	30.5	682
B2	DIA 15	3.3	9.34	30	624
B3		2.54	9.41	29.9	414
B4		2.95	9.57	29.8	326

Cuadro 39. Datos obtenidos de la tercera repetición en los biorreactores en operación

3RA REPETICIÓN					
BIORREACTORES	DIAS	OD (ppm)	pH	Temperatura (°C)	Biomasa microbiana (UFC)
B0		0.46	8.14	33.7	758
B1		0.63	8.14	29.2	985
B2	DIA 1	0.44	8.14	27.4	1386
B3		0.54	8.06	27.7	926
B4		0.43	8.04	27.6	2210
B0		2.43	8.76	29.9	583
B1		3.62	9.02	30.3	757
B2	DIA 8	3.4	8.83	30.5	1066
B3		2.43	8.92	29.9	712
B4		2.43	8.9	30.7	1699
B0		3.27	9.22	30.2	284
B1		3.85	9.49	30.5	682
B2	DIA 15	3.3	9.34	30	624
B3		2.54	9.41	29.9	414
B4		2.95	9.57	29.8	326

4.4.3. Correlación de variables

En el cuadro 40, se observa las correlaciones que existen entre las variables medidas, donde la variable dependiente de Microorganismos (M.O) tiene correlación con la variable independiente del Oxígeno Disuelto (OD), la variable independiente del Oxígeno Disuelto (OD) tiene mayor correlación con la

variable independiente del pH, la variable independiente de pH tiene correlación con la variable independiente del Oxígeno Disuelto (OD) y la variable independiente de T (°C) tiene correlación con la variable independiente del Oxígeno Disuelto (OD).

Cuadro 40. Correlaciones entre variables medidas en los biorreactores en operación

		OD	M.O	pH	T (°C)	Petróleo
OD	Correlación de Pearson	1	0,091	0,353	0,337	-0,041
	Sig. (bilateral)		0,748	0,196	0,219	0,886
	N	15	15	15	15	15
M.O	Correlación de Pearson	0,091	1	-0,046	-0,154	-0,040
	Sig. (bilateral)	0,748		0,871	0,583	0,887
	N	15	15	15	15	15
pH	Correlación de Pearson	0,353	-0,046	1	-0,603*	-0,883**
	Sig. (bilateral)	0,196	,871		0,017	0,000
	N	15	15	15	15	15
T (°C)	Correlación de Pearson	0,337	-0,154	-0,603*	1	0,687**
	Sig. (bilateral)	0,219	0,583	0,017		0,005
	N	15	15	15	15	15
Petróleo	Correlación de Pearson	-0,041	-0,040	-,883**	,687**	1
	Sig. (bilateral)	0,886	0,887	0,000	0,005	
	N	15	15	15	15	15

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

4.5. Análisis estadístico

El análisis de varianza para los promedios de microorganismos en la biotransformación del petróleo encontrado al finalizar los tratamientos (Cuadro 41), muestra que no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos a distintas concentraciones de petróleo a un 95 % de nivel de confianza.

Cuadro 41. Análisis de Varianza

FV	GL	Suma de Cuadrados	Media Cuadrática	F_{cal}	F_{tab}
Tratamientos	4	247160.27	61790.067	0.629	0.653
Error	10	982899.33	98289.933		
Total	14	1230059.60			

Se aprecia que en todos los grupos promedio de las concentraciones de petróleo y la biomasa microbiana no hay nivel de significancia con un 95 % de confiabilidad.

Prueba de Tukey

En el cuadro 42, se aprecia la prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95 % con la aplicación de los tratamientos en los biorreactores en operación.

Cuadro 42. Prueba de Tukey (HSD) con la variable dependiente de Biomasa Microbiana y la variable independiente de Petróleo

(I) PETROLEO	(J) PETROLEO	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95 % Límite inferior	Intervalo de confianza al 95 % Límite superior
T0	T ₁	53,333	255,982	1,000	-789,12	895,79
	T ₂	8,000	255,982	1,000	-834,46	850,46
	T ₃	297,000	255,982	0,773	-545,46	1139,46
	T ₄	-81,333	255,982	0,997	-923,79	761,12
T ₁	T ₀	-53,333	255,982	1,000	-895,79	789,12
	T ₂	-45,333	255,982	1,000	-887,79	797,12
	T ₃	243,667	255,982	0,870	-598,79	1086,12
	T ₄	-134,667	255,982	0,983	-977,12	707,79
T ₂	T ₀	-8,000	255,982	1,000	-850,46	834,46
	T ₁	45,333	255,982	1,000	-797,12	887,79
	T ₃	289,000	255,982	0,789	-553,46	1131,46
	T ₄	-89,333	255,982	0,996	-931,79	753,12
T ₃	T ₀	-297,000	255,982	0,773	-1139,46	545,46
	T ₁	-243,667	255,982	0,870	-1086,12	598,79
	T ₂	-289,000	255,982	0,789	-1131,46	553,46
	T ₄	-378,333	255,982	0,597	-1220,79	464,12
T ₄	T ₀	81,333	255,982	0,997	-761,12	923,79
	T ₁	134,667	255,982	0,983	-707,79	977,12
	T ₂	89,333	255,982	0,996	-753,12	931,79
	T ₃	378,333	255,982	0,597	-464,12	1220,79

Cuadro 42. Prueba de Tukey (HSD) con la variable dependiente de Biomasa Microbiana y la variable independiente de Petróleo (continuación...)

HSD Tukey

PETROLEO	N	Subconjunto para alfa = 0.05
T3	3	589,00
T1	3	832,67
T2	3	878,00
T0	3	886,00
T4	3	967,33
Sig.		0,597

Cuadro 42. Prueba de Tukey (HSD) con la variable dependiente de Biomasa Microbiana y la variable independiente de Petróleo (continuación...)

COMPARACION DE MEDIAS

	967	886	878	833	589
589	378	297	289	244	-
833	135	53	45	-	
878	89	8	-		
886	81	-			
967	-				

Conclusión:

Se puede concluir que el $|Y_i - Y_j| < \text{HSD}$; entonces se dice que esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Modelo Aditivo Lineal

En el cuadro 43, el análisis del Modelo Aditivo Lineal nos muestra que el error experimental e_{41} (UE₁₃) es el de mayor sesgo de medición del dato obtenido con un resultado de $|-1246.9|$ y el de menor sesgo lo tiene el error experimental e_{01} (UE₁) con un resultado de $|-347.6|$.

Cuadro 43. Correlación entre el Petróleo y la biomasa microbiana (M.O)

	Media	Desv. Desviación	N
Petróleo	3,00	1,464	15
M.O	830,60	296,414	15

Cuadro 43. Correlación entre el Petróleo y la biomasa microbiana (M.O)

(continuación...)

		PETROLEO	M.O
PETROLEO	Correlación de Pearson	1	-0,040
	Sig. (bilateral)		0,887
	Suma de cuadrados y productos vectoriales	30,000	-243,000
	Covarianza	2,143	-17,357
	N	15	15
M.O	Correlación de Pearson	-0,040	1
	Sig. (bilateral)	0,887	
	Suma de cuadrados y productos vectoriales	-243,000	1230059,600
	Covarianza	-17,357	87861,400
	N	15	15

V. DISCUSIÓN

En el suelo de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L., se analizó las siguientes propiedades físicas de la muestra, donde la permeabilidad del suelo es 0.89 cm/Hora, según GUERRERO (2013), pertenece a la clase de permeabilidad denominada prudentemente lenta donde está dentro del tipo de suelo; la conductividad Hidráulica del suelo es 0.51 cm/Hora, donde según SERVICE E.U.A. SOIL CONSERVATION (2008), pertenece a la clase denominada prudentemente pausada, para ello se utilizó el método de permeámetro de carga variable, donde se usan pequeños núcleos y columnas de suelo; el color del suelo analizado según MUNSELL (1975), y EDAFOLOGIA (2019), se expresó una Gradiente Munsell de 12.5, con un código de color del suelo Munsell de 2.5YR 4/8, con un color del suelo Munsell de color rojo, cuyo suelo se encuentra en el Horizonte A_g , y es normalmente encontrado a una profundidad de 0 – 5 cm y presenta moteados por la oxidación/reducción del Fe, con manchas de colores pardos/rojos con una Hidromorfia parcial (MUNSELL, 1975 y FAO, 2009); el moteado del suelo estudiado presente más del 40 % de abundancia de moteados, lo cual lo clasifica como demasiado cuantioso, tiene un contraste de los moteados catalogado como desigual con un código D, los moteados son observados con facilidad. Tanto la matriz, el valor y el croma son reconocibles a simple vista. La cual pueden diferenciarse por más de 2.5 componentes de la matriz, el valor o el croma; también tiene una categorización

de los tamaños de los moteados categorizado como demasiado suave por ser menor a 2 mm de tamaño con un código de MF, también tiene una categorización entre la matriz y los moteados de calmoso con código de C, con menos de 2 mm del espaciado entre el moteado y la matriz.

Según la FAO (2009), la consistencia del suelo en estudio tiene una clasificación en el suelo seco de consistencia blanda con un código de BL, con una abundancia del suelo es muy débil en consistencia y rompible; se vuelve polvo o gránulos en poca presión, también tiene una firmeza del suelo fresco que es considerado como demasiado disgregable con un código de MD, con un material de suelo que se aplasta bajo presión leve, pero es coherente cuando se lo presiona todo al mismo tiempo, donde se tiene una clasificación de la adhesividad del suelo que es considerada ligeramente adherente con una codificación de SST y luego de infringir presión al suelo, tampoco se une a la mano, como también no se despega posteriormente. No se dilata perceptiblemente cuando se alejan de los dedos. También presenta una categorización de la flexibilidad de los suelos que es considerado como levemente flexible con una codificación de LFL y este suelo se perfila como una tira del suelo, luego se destroza al momento si se realiza de una forma de un aro; el suelo se desfigura con una ligera presión.

El suelo de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L., se analizó las siguientes propiedades químicas donde se hizo una comparación del suelo sin contaminar y el suelo contaminado, la cual el suelo sin contaminar se obtuvo los siguientes resultados obtenidos: la concentración del Calcio (Ca) es

Baja (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002), la concentración del Magnesio (Mg) es Moderada (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002), la concentración del Aluminio (Al^+) es Moderada (CASTELLANOS, 2000), la concentración de la acidez (H^+) es Alta (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002), la concentración de la CICE es alta (SCHARGEL Y DELGADO, 1990); y para el petróleo refinado tiene una concentración que está dentro del Estándar de Calidad Ambiental para el suelo respecto al suelo Industrial que está por debajo como también apta para el uso del suelo agrícola (MINAM, 2017), la concentración del % de Saturación Cambiable es Alta (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002), la concentración del potasio (K) es muy baja (INIA, 2009), la concentración del fósforo (P) es baja (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002), la concentración del nitrógeno (N) es baja (NOM-021-RECNAT-2000), la concentración de la materia orgánica (M.O) es baja (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002), la concentración del pH es baja (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002); el análisis realizado al suelo contaminado con petróleo se obtuvo los siguientes resultados obtenidos: la concentración del calcio (Ca) es baja (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002), la concentración del magnesio (Mg) es baja (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002), la concentración del aluminio (Al^+) es moderada (CASTELLANOS, 2000), la concentración de la acidez (H^+) es moderada (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002), la concentración que se ha generado de la CICE es alta (SCHARGEL Y DELGADO, 1990); y para el petróleo refinado (HTP) tiene una concentración que está dentro del Estándar de Calidad Ambiental para el suelo respecto al suelo Industrial que está por debajo pero no es apta para el uso del suelo agrícola (MINAM, 2017); la concentración del cadmio (Cd) en el suelo es baja está dentro del Estándar de Calidad Ambiental para el suelo respecto al suelo Industrial y también es apta para el uso del suelo agrícola (MINAM, 2017); la concentración

del plomo (Pb) en el suelo es baja está dentro del Estándar de Calidad Ambiental para el suelo respecto al suelo Industrial y también es apta para el uso del suelo agrícola (MINAM, 2017); la concentración del cobre (Cu) en el suelo contaminado es óptima (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002); la concentración del boro (B) en el suelo contaminado es Alta (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002); la concentración del manganeso (Mn) en el suelo contaminado es Media (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002); la concentración del hierro (Fe) en el suelo contaminado es Alta (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002); la concentración del pH es baja (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002), la concentración del potasio (K) es Muy baja (INIA, 2009), la concentración del fósforo (P) es baja (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002), la concentración del % de saturación cambiante es alta (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002); la concentración del nitrógeno (N) es baja (NOM-021-RECNAT-2000), la concentración de la materia orgánica (M.O) es baja (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002), y la concentración del zinc (Zn) en el suelo contaminado es media (MELINA Y MELÉNDEZ, 2002).

El suelo de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L., se analizó las siguientes propiedades biológicas donde las tres repeticiones indican que la biomasa microbiana puede ser efectiva, pero necesita profundizar las pruebas de toxicidad para verificar condiciones tóxicas (IRAM 29555-1:2003); en la segunda repetición es la mayor población de actinomicetos y en la tercera repetición es la menor población de actinomicetos encontrados; en la primera y tercera repetición son las mayores poblaciones de hongos y en la segunda repetición es la menor población de Hongos encontrados.

En el suelo contaminado de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L., se pudo aislar e identificar las colonias bacterianas aplicando la prueba de diferenciación bioquímica, la cual se obtuvo colonias de géneros bacterianos como: *Enterobacter*, *Serratia*, *Salmonella* y *Proteus*; donde para que el sistema suelo-contaminante-microorganismos sea eficaz el recuento de heterótrofo mínimo deberá ser 10^3 UFC/g. Un recuento en placa inferior a 10^3 podría indicar la presencia de concentraciones tóxicas de materia orgánica o inorgánica. En estos casos, el suelo debe ser acondicionado para reducir las concentraciones de sustancias tóxicas y aumentar la densidad de población microbiana. Si la densidad poblacional es baja e insuficiente, la población puede incrementarse agregando microorganismos comerciales o cultivados ad hoc (BELTRÁN *et al.*, 2018).

En el suelo contaminado de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L., la cual se pudo comprobar crecimiento bacteriano en el medio mínimo de sales de Davis (MMS), a ciertas concentraciones del Petróleo refinado las cuales son: 0.25 %, 0.50 %, 0.75 % y 1.00 %; en las tres repeticiones crecieron en todas las placas (16) por repeticiones, resultando como indicador de una posible biorremediación del suelo frente a un derrame de petróleo.

En el suelo contaminado de la empresa Maple Gas Corporation del Perú S.R.L., se observó mayor porcentaje de eficiencia microbiana es en la primera repetición del biorreactor cuatro (B₄) a una concentración de 1 mL de petróleo con un +13.658 %, y donde se menor porcentaje de eficiencia microbiana es en la segunda repetición del biorreactor cuatro (B₄) a una

concentración de 1 mL de petróleo con un -85.249 %, esto es debido a muchos factores como: temperatura, pH, Oxígeno disuelto y Microorganismos; donde el rango óptimo de operación de los biorreactores es de 6 – 8 de pH, como efecto tiene la actividad microbiana y también la solubilidad y adsorción del contaminante, el rango óptimo de temperatura para la velocidad de degradación es óptima ya que están dentro del rango de 15 °C y 45 °C; también influye la oxidación a través de enzimas oxigenasas, a intermediarios que se incorporan al ciclo de Krebs en referencia a la disponibilidad de oxígeno; la población microbiana realiza una adaptación o aclimatación de una comunidad a un contaminante dado, determina la rapidez con la que el compuesto puede ser transformado y mineralizado (FEITKENHAUER *et al.*, 2003; SEMPLE *et al.*, 2001; MADIGAN *et al.*, 2004; ALEXANDER, 1994; LAGREGA *et al.*, 2001).

El análisis estadístico de la comparación del petróleo refinado con la biomasa microbiana nos da una conclusión que no hay nivel de significancia a un 95 % de confiabilidad en el análisis de varianza, y que en la prueba de Tukey (HSD) donde no se concluye que no hay significancia, y en el análisis del Modelo Aditivo Lineal donde en el error experimental (e_{11}) muestra menor error en la medición del resultado, mientras que en el error experimental (e_{41}) muestra mayor error en la medición del resultado, esto es debido a diversos factores tales como: tiempo de medición de la temperatura, variabilidad del OD, pH y el conteo de la densidad microbiana lo que ocasiona estos sesgos estadísticos obtenidos.

VI. CONCLUSIONES

1. Se determinó la capacidad biodegradadora de petróleo con los microorganismos encontrados y seleccionados de una refinería.
2. Se determinó las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo contaminado con petróleo y un suelo limpio para una comparación la cual indica que no hay un impacto significativo cuando existe la presencia de un posible derrame de un petróleo.
3. Se aisló e identificó la población bacteriana heterótrofa del suelo contaminado con petróleo estudiado encontrándose diferentes géneros: *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* y *Salmonella*.
4. Se seleccionó y eligió las colonias de bacterias con capacidad degradativa del hidrocarburo en el suelo contaminado con petróleo.
5. Se determinó una eficiencia de capacidad degradativa microbiana del suelo contaminado con petróleo refinado usando el biorreactor Air Lift, llegando a encontrar una mayor eficiencia microbiana en la primera repetición de las tres repeticiones realizadas en el biorreactor (B₄) con una tasa de eficiencia degradativa positiva de +13.658 % en base al crecimiento bacteriano.

VII. RECOMENDACIONES

1. Aplicar una biorremediación ex situ para determinar la eficiencia microbiana en biorreactores para una posible biorremediación ante un posible derrame de petróleo.
2. Se recomienda realizar un modelamiento de derrame de petróleo para predecir el curso de distribución del hidrocarburo a fin de tomar la mejores las medidas de seguridad pertinente como también el impacto que ocasionaría y las medidas correctivas y preventivas para que no sea un impacto significativo.
3. Se recomienda cuantificar la concentración de hidrocarburos totales de petróleo (HTP), en usando el cromatógrafo de gases para determinar su concentración con mayor precisión y según ello determinar que colonias o biofilm bacteriano es mejor para una biorremediación frente a un posible derrame de petróleo y cumplir con las normativas legales nacionales e internacionales para que no sea un impacto significativo al ambiente y a la salud humana.

ABSTRACT

Isolated microorganisms from the soil of a refinery were studied for their degradation capacity, in order to determine their rate of efficiency when developing in soil contaminated with refined petroleum. A sample from the soil of a refinery in the city of Pucallpa, Ucayali, Peru, was used. The microorganisms present in the soil were isolated and identified. The physical and chemical characteristics of the soil were tested in airlift bioreactors before and after contamination from the petroleum, at concentrations of 0.25 mL, 0.5 mL, 0.75 mL and 1.0 mL of refined petroleum; the microorganisms which were previously isolated and identified were inoculated. It was found that the production rate for biomass is around 13% under conditions of development where the pH is between 8.2 and 9.0, with a DO (O.D. in Spanish) of 0.77 to 3.57 mg/L and a temperature between 27.6 and 30.8 °C; the degradation efficiency rate (determined by the microbiological development) is apparently low in terms of degradation, but does allow the microorganisms to continue to be viable in the soil of the refinery. Under extreme conditions these microorganisms could be adequately processed, with technical genetic modifications, in order to increase their rate of degradation efficiency for petroleum degradation. The microorganisms that were identified belong to the Enterobacter, Proteus, Salmonella, Serratia and bacteria genre from the actinobacteria group.

Keywords: Petroleum, degradation, Air lift bioreactors.

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- AASHTO T 248. (2014). Standard Method of Test for Reducing Samples of Aggregate to Testing Size. 7pp.
- ACEVEDO, E., M. CARRASCO, O. LEÓN, P. SILVA, G. CASTILLO, I. AHUMADA, G. BORIE, Y S. GONZÁLEZ. 2005. Informe de criterios de calidad de suelo agrícola. Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. 205pp.
- AGROPECSTAR. (2001). Conceptos. [En línea]: (<http://www.agropecstar.com/portal/doctos/Conceptos%20de%20produccion.htm>. 23 de Ago. 2019)
- AGUILAR, R. (2002). Producción de Sustratos para Viveros. Proyecto Regional de Fortalecimiento de la Vigilancia Fitosanitaria en Cultivos de Exportación no Tradicional. Costa Rica. 46pp.
- AGUILERA HERRERA N. (1989). *Tratado de Edafología de México*. Tomo 1ed. Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de México. México.
- ALEXANDER, M. (1961). Introduction to soil microbiology. John Wiley. New York, USA. 472pp.
- ALEXANDER, M. 1994. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, San Diego, USA. 302pp.

- ALTAMIRANO, M. y POZZO, M. (2000). Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburoclíticas provenientes de un suelo sometido a biorremediación. XXVII Congreso interamericano de Ingeniería ambiental y sanitaria. Buenos Aires, Argentina. 6 pp. [En línea]: (www.ingenieroambiental.com/new2informes/bacteriasbioremediacionpetroleo.pdf. 20 oct. 2018)
- ASKEW, H. C. (1951). Some aspects of boron deficiency in plants. Proc. Spec. Conf. Plant. Anim. Nutrit. Australia. 1949: 9-125pp.
- BALL, B. C., D. J. CAMPBELL, and E. A. HUNTER. 2000. Soil compactibility in relation to physical and organic properties at 156 sites in UK. Soil and Tillage Res. 57: 83–91pp.
- BAIRD, G. (1952). Some studies on the characterization of available soil boron. Cornell University. 113pp.
- BARRENA, R. 2006. Compostaje de residuos sólidos orgánicos. Aplicación de técnicas respirométricas en el seguimiento del proceso. Memoria de Tesis. Departamento de ingeniería Química. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona-España.
- BELTRÁN, M., BRUTTI, L., GARCÍA DE SALAMONE, I. 2018. Biorremediación de los Recursos Naturales. Ediciones INTA - Instituto de Suelos Centro de Investigación de Recursos Naturales. HURLINGHAM, BUENOS AIRES. 492pp.
- BENTON JONES, J. Jr. (1991). Universal soil extractants: Their composition and use. Comm. In Soil Sci. And Plant Anal. 21: 1091-1102pp.

- BETANCOUR, M. 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. Colombia médica. VOLUMEN 35. N° 3 (Supl 1), Cali, Colombia, 10pp
- BERGER, K.C. y TRUOG, E. (1939). Boron determination in soils and plants. Ind. Eng. Chem. Anal. 11: 540-545pp.
- BOHN, H. (1993). Química del Suelo. 1ed. México: Noriega Editores
- BOUYOUCOS, G. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. Agron. J., vol. 54, 464-465pp.
- BOWLES, J. E. 1980. Manual de laboratorio de suelos en ingeniería. México: Mc Graw-Hill. 233pp.
- BUCKMAN HARRY AND N.C. BRADY. (1966). The Nature and Properties of Soils. The Macmillan company. 590pp.
- BURGOS R. 1999. Degradación de hidrocarburos. Disponible en <http://www.bioinformatica.uab.es>. Consultado el 03 jun. 2004.
- CARLSON, C. 1998. Influences of sorption on microbial degradation. University of Lund. Sweden. [En línea]: (<http://www.ecotox.lu.se>. 03 jun. 2004)
- CARREÑO, C., HURTADO, A. & MENDOZA, V. (2010). Microbiología General. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- CASTELLANOS, J.Z. 2000. Manual de Interpretación de Análisis de Suelos y Aguas. Segunda edición. Intagri, S.C. Guanajuato, México 226pp.
- CASTILLO, F., BLASCO, R., CABALLERO, F., CONRADO, M., HUERTAS, M. J., LUQUE, M. M., y ROLDÁN, M. D. 2005. Biotecnología ambiental. Editorial Tébar. Madrid, España. ISBN: 978-84-7360-395-9. 616pp.
- CELA, R., LORENZO, R.A., CASAIS, M. C. (2002). Técnicas de Separación en Química Analítica, Ed. Síntesis, Madrid, España.

- CHAINEAU, C. H.; C. YEPREMIAN, J. F. VIDALIE, J. DUCREUX Y D. BALLERINI. (2003). Bioremediation of a Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching and Toxicity Assessments. *Water, Air, and Soil Pollution*. 144:419-440pp.
- CHANG, I., W. (2013). valuación del efecto del encalado (calcita), en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis mención Conservación de Suelos y Agua. Tingo María, Perú, Universidad Nacional Agraria de la Selva. 131 pp.
- CHO, B, H.; CHINO, H.; TSUJI, H.; KUNITO, T.; UCHIDA, H; MATSUMOTO, S., and OYAIYU, H. 1997. Analysis of soil components and hydrocarbon utilizing microorganisms during laboratory scale bioremediation of soil contaminated soil of Kuwait. *Chemosphere*: 35:1613-1621pp.
- CHOW, S. 1998. *Petroquímica y sociedad*. Fondo de Cultura Económica. 2ed. México, D.F., México. 18pp. ISBN 968-16-5430-7
- COELLO. 2005. Análisis de métodos de estimación de la conductividad hidráulica saturada en suelos degradados. Universidad de Cuenca. 52pp.
- COLERMAN, N.T., WEED, S.B. y MCCRACKEN, R.J. (1959). Cation exchange capacity and exchangeable cations in Piedemont soils of North Carolina. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 23:146-149pp.
- CRISPIN, R. y SUMMERLIN, L. (1998). *Química*. Publicaciones, Cultural, México.
- DAS, B. M. 2019. *Advanced Soil Mechanics*. Fifth Edition. Editorial, CRC Press. ISB 13: 978-0-8153-7913-3. 712pp.
- DIBBLE, J. R. Y R. BARTHA. (1979). Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Env. Microbiol.* 37:729-739pp.

- DOMÉNECH X. (1995). Química de Suelos, El impacto de los contaminantes. Miraguano. Madrid, España. 190pp.
- DONADO, L. 2004. Modelo de conductividad hidráulica en suelos. Modelo de conductividad hidráulica en suelos. Bogotá D.C., Colombia.
- DONCEL UNANUA, A.J., IÑIGUEZ HERRERO, J., VAL LEGAZ, R.M. (1996). Relación del contenido de boro soluble con distintos parámetros edáficos y ambientales del suelo de Navarra. Munibe Ciencias Naturales. Natur zientziak. N°48: 21-38pp.
- EDAFOLOGIA. (2019). EL SUELO: CONCEPTO Y FORMACION. [Visto en]: <http://www.edafologia.net/introeda/tema01/perfil4.htm>, consultado el 18 de noviembre de 2019.
- ENERGÍASUR, 2016. Cronología de derrames petroleros en Perú. [Visto en]: <http://energiasur.com/cronologia-de-derrames-petroleros-en-peru/>, consultado el 26 mayo del 2019.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 1994. Minister of Public Works and Government Services Canada. Guidance Document on Collection and Preparation of Sediments for Physicochemical Characterization and Biological Testing. Method Development and Applications Section Environmental Technology Centre Environment Canada Ottawa, Canada. Catalogue No. En 49-24/1-29E.
- EDWARDS. R., LARIVE. J.F., MAHIEV. V., ROUVEIROLLES. P. (2007). Well-to-wheels analysis of future automotive fuels and powertrains in the european context. TANK-to-WHEELS Report Version 2c, March. 41pp
- FAO., 2009. Guía para la descripción de suelo, 4ed. Editorial Viale delle Terme di Caralla. Roma, Italia. 111pp.

- FAO. (2018). Textura del suelo. [En línea]: (http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/x6706s06.htm, 16 Oct. 2018)
- FAUSAC. 2014. PRACTICAS DE LABORATORIO EDAFOLOGIA I. [En línea]: (<https://es.scribd.com/doc/269100779/MANUAL-DE-PRACTICAS-DE-LABORATORIO-EDAFOLOGIA-1-pdf>, 07 Set. 2018)
- FEITKENHAUER, H., MÜLLER, R., y MÄRKL, H. 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60-70 degrees C by Thermus and Bacillus spp. *Biodegradation* 14(6):367-72pp
- FERRER, M. I. (1997). Selección de tecnologías de restauración biológica para lodos de perforación en tres campos petroleros. Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Ing. Ambiental, Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- FIGUEROA., C. et al. (2016). Densidad aparente y densidad real del suelo. [En línea]: (https://www.academia.edu/25707562/UNIVERSIDAD_NACIONAL_AGRARIA_LA_MOLINA_NOMBRE, 15 Oct. 2018)
- FLORES, M., TORRAS, S., TÉLLEZ, R. (2004). Medidas de mitigación para uso de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos en infraestructura de transporte terrestre. México D.F., México. 83pp
- FLORES, D.L. Y ALCALÁ, M.J.R. (2010). Manual de procedimientos analíticos. Laboratorio de Física de suelos. Instituto de Geología. Departamento de Edafología. UNAM. Fecha de consulta: 12/10/2018 en: <http://www.geologia.unam.mx/igl/deptos/edafo/lfs/manualLFS.pdf>

- FLORES, Y; MARQUES MJ, MORA, J.M. y SALGADO P, (2012). Manual de Prácticas de Microbiología General II. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 130pp.
- GARCÍA, S. J. P., LUCENA, M. J. J., NOGALES, G. M., RUANO, C. S. (2009). Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. ISBN: 978-84-491-0997-3. 120pp
- GARRIDO, S. (2001). Interpretación de análisis de suelos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- GUERRERO, J. 2013. Recuperación de suelos degradados por erosión, contaminación, salinización y acidez. Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Agronomía. Lima, PE. 138-154 pp.
- GOMEZ M., CAMPOS N., HURTADO C., CASANOVA R. (2008). Selección y aplicación de bacterias con capacidad degradadora. Programa de Calidad Ambiental Marina. Instituto de Investigaciones marinas y costeras. Bogotá, Colombia. 18pp
- GRANT, W.D. (1981). Environmental microbiology. John Willet and Sons. New York, USA. 207pp
- GRAU, C. J. M., LÓPEZ, A. M., RODRÍGUEZ M. J. A. 2009. Metales pesados, materia orgánica y otros parámetros de los suelos agrícolas y de pastos de España. INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria). MARM. 226pp
- HATCHER, J. T. and WILCOX, L. V. (1950). Colorimetric determination of Boron Using Carmine. Anal. Chem. 22. 567pp.

- HATTORI, T. (1973). Microbial life in the soil; An introduction. M. Dekker. New York, USA. 427pp.
- HEINONSALO K, S., JORGENSEN, K., HAAHTELA AND SEN R. (2000). Pinus sylvestris root growth and mycorrhizosphere development on bacterial carbon source utilization and hydrocarbon oxidation in forest and petroleum-contaminated soils. Canadian Journal of Microbiology, 46: 451-464pp.
- IBAÑEZ, J. (2007). Carbonatos del Suelo: Curso de Diagnóstico de Suelos en Campo (Régulo León Arteta). [En línea]: (<http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2007/05/01/64693>, 08 Set. 2018)
- INGEMMET. 2019. Mapa Geomorfológico. (Visto en): <https://www.ingemmet.gob.pe/mapageomorfologico?inheritRedirect=true>, visto el día 16/12/2019 a las 20:50
- INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria), 2009. Metales pesados, materia orgánica y otros parámetros de los suelos agrícolas y de pastos de España. MARM.
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETROLEO (IMP). 2002. El petróleo. Disponible en <http://www.imp.mx>, Consultado el 4 de Mar. 2004.
- INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA (2003). Ambiente y Desarrollo. Lima, Perú.
- JACKSON, M. 1964. Análisis químico de suelos. 2da Edición. Ed. Omega S.A. Barcelona, España. 653pp.

- KENNEDY, V.H., SANCHEZ, A.L., OUGHTON, D.H., Y ROWLAND, A.P. (1997).
Use of single and sequential chemical extractants to assess radionuclide
and heavy metal availability from soils for root uptake. *Analyst*, 122(8),
89R-100R.
- KIRBAG ZF., MUNZUROGLU O., (2003), Effects of cadmium (Cd^{++}) and mercury
(Hg^{++}) on the growth of root, shoot and leaf of bean (*Phaseolus vulgaris*
L.) seedlings, *Cukurova University J. Sci.* 24 (1): 64-75pp.
- LAGREGA, M. BUCKINGHAM, L., EVANS, J. (1996). *Gestión de Residuos
Tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. Volumen II.*
McGraw-Hill. Madrid, España. 316pp.
- LEAHY, J.G. y R.R. Colwell. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the
environment. *Microbiology Review.* 54, 305-315pp.
- LEVIN M. y GEALT M., (1997). *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos.*
McGraw-Hill. Madrid, España. 153pp.
- LÓPEZ, C. (1990). *Protocolos de prácticas de Microbiología Ambiental.*
Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú.
- LÓPEZ, A. (2006). *Manual de edafología.* Departamento de Cristalografía,
Mineralogía y Química Agrícola de la Universidad de Sevilla. 143pp.
- LÓPEZ, C. (2006). *Protocolos de prácticas de Biotecnología.* Facultad de
Recursos Naturales Renovables. Especialidad de Ingeniería Ambiental.
Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú.
- MADIGAN, M.T., J.M. MARTINKO Y J. PARKER. 2004. *BROCK: Biología de los
microorganismos.* 10ed. Prentice Hall.

- MANZANARES, E., VEGA, H., SALAS, M., HERNÁNDEZ, V., LETECHIPIA DE LEÓN, C. y BAÑUELOS, R., (2006), Niveles de plomo en la población de alto riesgo y su entorno en San Ignacio, Fresnillo, Zacatecas, México, *Salud pública de México*, 48:212-219pp.
- MARTÍNEZ, VÍCTOR E.; LÓPEZ S., M. Y FELIPE. (2001). Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso *Terra Latinoamericana*, vol. 19, núm. 1. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Chapingo, México. 9-17pp
- MCCULLOUGH J, HAZEN T, BENSON S, METTING F, PALMISANO A., 1999. Bioremediation of metals and radionuclides. [En Línea]: (<http://www.escholarship.org/uc/item/8s57v0cs?display=all>, documento, 25 julio. 2014)
- MCKEAN SHEILA J. 1993. Manual de análisis de suelos y tejido vegetal. Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT. Laboratorio de servicios Analíticos. Documento de trabajo N° 129. 103pp
- MCLEOD, F., GUIOT. S., COSTERTON, J.W. 1990. Layered structure of bacterial produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Appl. Environ. Microbial.* 18pp
- MEHLICH, A. (1984). Mehlich-3 soil test extractant. A modification of Mehlich-2 extractant. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v.15, N°.12.1409-1416pp.
- MENN, F-M., J. P. EASTER y G. S. SAYLER. (2000). Bacterial activity enhancement and soil decontamination. In H.J.Rehm, G.Reed, A.Pühler and P.Stadler, editors, *Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination*. Wiley-VCH. Weinheim. 425-439pp.

- MILLAR C. E. (1955). Soil fertilit. New York. John Willey & Sons. 436pp.
- MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA RELACIONES CON LAS CORTES E IGUALDAD. (2005) Real Decreto 9. [En línea]: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2005/BOE-A-2005-895-consolidado.pdf>, el 14 de Ene de 2020.
- MINISTERIO DEL AMBIENTE. (2017). Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo. Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM. 4pp
- MIRANDA, H., ROBLES, H., VILLANUEVA, L., RODRIGUEZ, C. 2006. Biorreactores, Diseño y Aplicaciones, Sociedad Peruana de Biotecnología, Trujillo, Perú.
- MONTOYA, A., A. BONO, M. BARRACO Y M. DÍAZ ZORITA. (2003). Boro, un nutriente que crea incertidumbre: Experiencias de fertilización en la región pampeana. Bol. Divul. Técnica N° 78, ISSN 0325-2167.
- MORRISON, R., BOYD, R., (1998). Química orgánica. 5 ed. Ed. Addison Longman de México S.A. de C.V. ISBN 968 444 340 4. Naucalpan de Juárez, México. 1499pp.
- Munsell Colour Company. 1975. Munsell soil color charts. (Munsell Color Co.: Baltimore, MD)
- Munsell Colour Company. 1994. Munsell soil color charts. (Munsell Color Co.: Baltimore, MD)
- MURADO, M. A., MIRÓN, J. Y GONZÁLEZ, M. P. (1996) Tratamiento microbiológico de la contaminación por petróleo en ambientes marinos. Estudio de su posible optimización. In: M.M.A (Eds), seguimientos de la contaminación producida por el accidente del buque AEGEAW.

- Monografías del Ministerio de Medioambiente. Madrid, España. 168-185pp.
- NAVARRO, S., NAVARRO, G. (2003). Química agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales en la vida vegetal. 2ed. Mundi Prensa, España.
- NOM-021-RECNAT-2000: Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos.
- OLSEN, SR; CV COLE; FS WATANABE & LA DEAN. (1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. USDA Washington, D.C. Circular 939pp
- OLIVA, D. P. (2009). Determinación de la acidez intercambiable ($Al^{+3} + H^+$) a partir del pH para la estimación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) en suelos de la cuenca del Pacífico en El Salvador, Honduras y Nicaragua (tesis de pregrado). Universidad Zamorano, Zamora, Honduras.
- PASTOR, J. 2000. Utilización de sustratos en vivero. Universidad de Lleida, Dpto. de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería. Madrid, España. 231-235pp.
- PEECH, M. (1965). Hydrogen ion activity in Methods of Soil Analysis Part 2; C.A. edit. C.A. Black. 14-26pp.
- PORTA, M., LÓPEZ, A., ROQUERO, C. (1999). Edafología para la agricultura y el medio ambiente. 2ed. Ediciones Mundi Pren. Bilbao, España. 622pp.
- RATHOR A. y ALVAREZ-COHEN, L. 2003. Aerobic biotransformation of Gasoline Aromatics in MultiComponent Mixtures, Bioremediation J. 4(2): 171-179pp.

- RISER-ROBERTS E., (1998). Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes. CRC Press, Lewis Publishers. Boca Ratón, Florida, USA. 542pp.
- RODRÍGUEZ, F.H., RODRÍGUEZ, J. (2002). Métodos de análisis de suelos y plantas. Criterios de interpretación. Edit. Trillas S.A. 187pp.
- SARUBBI, A. (2000). Aspectos importantes en biorremediación. AIDIS Argentina. [En línea]: (<http://www.aidisar.org>., 15 ene. 2004)
- SANZANO, A. (1999). El Potasio del Suelo. Química del Suelo. Catedra de Edafología. Cartilla Técnica. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Tucumán, Argentina. 3pp.
- SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES (SEMARNAT). (2009). Metales Pesados. <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/763-aqre-metales>, visto el día 15/01/2020 a las 15:34pm
- SCHULTER C. E. and STEPHENSON R. E. (1940). Sunflowers as an indicator plant of boron deficiency .in soils. J. Am. Soc. Agron. 32:607-621pp.
- SCHARGEL W., R. y DELGADO, F. 1990. Características y manejo de los suelos utilizados en la producción de carne en Venezuela. In Plasse, D., Peña de Borsotti, N, eds. VI Cursillo sobre Bovinos de Carne. FCV-UCV, Maracay. 187-220pp.
- SCHLICHTING, E., BLUME, H.-P. Y STAHR, K. 1995. Bodenkundliches Praktikum. Segunda edición. Vienna, Berlin. Blackwell. 295pp.
- SCRAAG, A. 2002. Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos. México. Ed: Limusa. 410pp.

- SELLES, V., G., FERREYRA E., R., AHUMADA B., R., MUÑOZ, I. (2000). Validación y transferencias de tecnologías de riego y sistemas productivos en áreas regadas. Provincias de San Felipe y Los Andes. Convenio INIA-CNR. Informe final. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, San Felipe. 187pp.
- SEMPLE, K.T.; REID, B.J.; FEMOR, T.R. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soil contaminated with organic pollutants. *Environmental pollution* 112:269-283pp.
- SERVICIO NACIONAL DE APRENDIZAJE (SENA). 2013. Manual de Prácticas de Campo y del Laboratorio de Suelos. CENTRO AGROPECUARIO "LA GRANJA" ESPINAL – TOLIMA. 103pp.
- SIERRA, C. (2018). Las claves para alcanzar el nivel óptimo de humedad en el suelo. [En línea]:
(<http://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Análisis/2017/12/04/Las-claves-para-alcanzar-el-nivel-optimo-de-humedad-en-el-suelo.aspx>, 08 Set. 2019)
- SINIA (2019). Zonificación Ecológica Económica Base para el ordenamiento territorial de la Región Huánuco. [Visto en]:
<https://sinia.minam.gob.pe/documentos/zonificacion-ecologica-economica-base-ordenamiento-territorial-region>, el 23 de Jul. 2019
- SOIL CONSERVATION SERVICE E.U.A. (2008). Drainage Surveys. U.S. Soil Conservation Service, Section 16. Washington, U.S.A.
- SOLANAS, A., 2009. Biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos, Universidad de Barcelona, Vol IX, Barcelona, España. 34pp.

- SYLVIA, D., FUHRMANN, J., HARTEL, P. & ZUBERER, D. (1999). Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall. Nueva York. 89-92pp.
- SOARES, I., FLORES, A., MENDONÇA, M., BARCELOS, R. & BARONI, S. 2011. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. Arquivos do Instituto Biológico. 78(2):341-350pp
- SOIL SURVEY DIVISION STAFF (SSDS). 1993. Soil survey manual. Handbook No. 18. United States Department of Agriculture (USDA). Washington D.C. 437pp.
- STOODLEY, P., SAUER. K., DAVIES. D., COSTERTON. J. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. Microbiol. 22pp.
- THAUER. R., STACKEBRAND, E., HAMILTON. A. 2007. Energy metabolism and phylogenetic diversity of sulphate – reducing bacteria. Barton L.L y Hamilton A. Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems. Cambridge University Press. 27pp.
- TOTAL PETROLEUM HYDROCARBONS CRITERIA WORKING GROUP SERIES, (1998). Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Enviromental Media, Estados Unidos. ISBN 1-884-940-14-5. Ed. Wade Weisman. 98pp
- US EPA 821-B-94-004 (Method 1664). (1995). N-hexane extractable material (HEM) and silica gel treated N-hexane extractable material (SGTHEM) by extraction and gravimetry (oil and grease and total petroleum hydrocarbons).
- UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA. (2005). Edafología para Ciencias Ambientales. Área de Edafología y Química Agrícola. Facultad de Ciencias.

- VAN DEUREN, J., Z. WANG, Z. Y J. LEDBETTER. 1997. Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ra Ed. Technology Innovation Office, EPA. <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.
- VERGARA, A.; ALARCÓN, N. A.; AROCA, G. E., LARA, L. 2005. Effects of Gas Flow Rate, Inlet Concentration and Temperatura. 93(2): 9-165 p. [En Línea]: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233182>, documento, 20 julio 2014).
- VOLKE, T., Y VELASCO, J. (2002). Tecnologías de Remediación para Suelos Contaminados. Instituto Nacional de Ecología. INE-SEMARNAT. México. D.F., México.
- WALKLEY, A Y I.A. BLACK. (1934). An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 29-38.
- WALLACE, T. (1943). The diagnosis of mineral deficiencies in plants. Long Ashton, Bristol London. His Majesty's Stationary Office M.C., D.Sc., A.I.C. 107pp.
- WOODING, G. (1967). Los suelos, su origen, constitución y clasificación. Ediciones Omega S.A. Barcelona. McGraw-Hill Interamericana quinta edición 2005. México. 739pp.
- YUAN, T.L. (1959). Determination of exchangeable hydrogen in soils by titration method. *Soll Sci.* 88:164-167pp.
- ZHU, X., VENOSA, A. D., CUIDAN, M. T. Y LEE, K. (2001). Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati (USA).

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A. Análisis estadísticos

Prueba de distribución normal

1) Planteamiento de la hipótesis

H_0 : PAS = DN

H_a : PAS \neq DN

2) Nivel de significancia

$\alpha = 0,01$

3) Decisión estadística

Según Kolmogorov-Smirnov:

Sig. $\geq \alpha$; Aceptamos la H_0

Sig. $< \alpha$; Aceptamos la H_a

4) Conclusión

Análisis de varianza (ANVA)

1) Planteamiento de la hipótesis

H_0 : $A_1 = A_2 = A_3 = A_4 = A_5 = A_6 = A_7$

$H_a: A_1 \neq A_2 \neq A_3 \neq A_4 \neq A_5 \neq A_6 \neq A_7$

2) Nivel de significancia

$\alpha = 0.01$

3) Decisión estadística

Según la distribución normal

Sig. $\geq \alpha$; Aceptamos la H_0

Sig. $< \alpha$; Aceptamos la H_a

4) Conclusión

Cuadro 44. Diseño de análisis de varianza (ANVA)

FV	GL	SC	CM	F_c	Ftab
Tto	t-1	SCtto	CMtto		
Ee	T(r-1)	SCee	CMee		
Tt	Tr-1	SCtt			

Prueba de Tukey

Cuadro 45. Diseño de Tukey

OH	Tratamientos	Promedio	Subconjunto para alfa = 0.01	
			1	2
1	T_0			
2	T_1			
3	T_2			
4	T_3			
5	T_4			

Prueba de Pearson

1. Planteamiento de la hipótesis

H₀: Existe correlación estadísticamente significativa entre las partículas atmosféricas sedimentables y los microorganismos patógenos del aire con un nivel de confianza del 95 %.

H_a: No existe correlación estadísticamente significativa entre las partículas atmosféricas sedimentables y los microorganismos patógenos del aire con un nivel de confianza del 95 %.

2) Nivel de significancia

$$\alpha = 0,01$$

3) Decisión estadística

Según correlación de Pearson:

Sig. $\leq \alpha$; Aceptamos la H₀

Sig. $> \alpha$; Aceptamos la H_a

4) Conclusión

Cuadro 46. Diseño de Correlaciones de Pearson

	Microorganismos patógenos	PAS
Microorganismos patógenos	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	
PAS	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	

** La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral)

* La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral)

Cuadro 47. Escala de índice de correlación de Pearson

Rango	Índices de R y Rh _o	Escala
1	0.00 – 0.20	Ínfima correlación
2	0.20 – 0.40	Escasa correlación
3	0.40 – 0.60	Moderada correlación
4	0.60 – 0.80	Buena correlación
5	0.80 – 1.00	Muy buena correlación

Cuadro 48. Rango de interpretaciones de los coeficientes de varianza

Rango	Escala
CV ≤ 10 %	Existe poca variabilidad
10 ≤ CV ≤ 33 %	Existe una variabilidad aceptable
33 ≤ CV ≤ 50 %	Existe una variabilidad excesiva pero tolerable
CV > 50 %	Existe una variabilidad excesiva

Modelo Aditivo Lineal

Aplicando la fórmula siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij},$$

Donde:

Y_{if} = Es la respuesta obtenida en la k-ésima observación a la cual se le aplica el i-ésimo tratamiento.

$i = 1; 2; 3; 4; 5$ tratamientos.

$j = 1; 2; 3$ repeticiones.

μ = Media poblacional

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

e_{ij} = Error experimental.

Para:

$i = 1, 2, 3, 4, 5$ tratamientos.

$j = 1, 2, 3$ repeticiones

**ANEXO B. Identificación de presencia y ausencia de los microorganismos
en la primera repetición**

Cuadro 49. Reconocimiento de la presencia o ausencia de bacterias en seis
diferentes medios de cultivos de la muestra del suelo.

Zona de muestreo	M₇₇	Cled	McConkey	Actinomicetos	Manitol Salado	Cetrimide
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (1ra repetición)	+	+	-	+	+	-
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (2da repetición)	+	+	+	+	+	-
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (3ra repetición)	+	+	+	+	+	-

**ANEXO C. Selección de placas para la realización de pruebas
bioquímicas**

Cuadro 50. Selección de las placas conforme al crecimiento presentado para cada muestra.

Zona de muestreo	Placa seleccionada 1ra muestra
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (1ra repetición)	M ₇₇ Cled
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (2da repetición)	M ₇₇ Cled McConkey
Refinería Maple Gas Corporation del Perú (3ra repetición)	M ₇₇ Cled McConkey

ANEXO D. Pruebas de diferenciaciones bioquímicas de las bacterias

Cuadro 51. Reconocimiento de bacterias de la muestra del suelo en la primera repetición

MEDIOS	M ₇₇ (M ₁)	CLED (M ₁)	CLED (M ₂)
INDOL	-	-	-
VP	-	+	+
RM	+	-	-
SIM	+	+	+
MALONATO	-	-	-
TSI	(K/A + H ₂ S) (+)	(K/A) +	(K/A) +
UREA	+	+	+
LIA	(K/A + H ₂ S) (+)	(K/A + H ₂ S) (+)	K/K (-)
CITRATO	-	-	+

Cuadro 52. Reconocimiento de bacterias de la muestra del suelo en la segunda repetición

MEDIOS	Mac Conkey (M ₁)	M ₇₇ (M ₁)	CLED (M ₁)	Mac Conkey (M ₂)	M ₇₇ (M ₂)	CLED (M ₂)
INDOL	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	+	+
RM	-	-	-	-	-	-
SIM	-	-	-	+	+	+
MALONATO	-	+	+	-	+	+
TSI	K/K (-)	K/A (+)	K/A (+)	K/A (+)	K/A (+)	K/A (+)
UREA	-	-	-	-	-	-
LIA	K/K (+)	K/A (+)	K/A + H ₂ S (+)	K/A (+)	K/A (+)	K/A (+)
CITRATO	-	+	+	-	+	+

Cuadro 53. Reconocimiento de bacterias de la muestra del suelo en la tercera repetición

MEDIOS	Mac Conkey (M₀₋₁)	Mac Conkey (M₀₋₂)	Mac Conkey (M₁₋₁)	Mac Conkey (M₂₋₁)	Mac Conkey (M₂₋₂)
INDOL	-	-	-	-	-
VP	+	+	-	+	+
RM	-	-	+	-	-
SIM	-	+	+	-	-
MALONATO	+	+	+	+	+
TSI	A/A + gas (+)	K/K (-)	K/K + H ₂ S (-)	K/K + H ₂ S (+)	A/A + gas (+)
UREA	+	+	+	+	+
LIA	K/K (-)	K/K (-)	K/K (-)	K/K (-)	K/K (-)
CITRATO	+	+	+	+	+

Cuadro 53. Reconocimiento de bacterias de la muestra del suelo en la tercera repetición (continuación...)

MEDIOS	Mac Conkey (M₃₋₁)	Mac Conkey (M₃₋₂)	Mac Conkey (M₄₋₁)	Mac Conkey (M₄₋₂)
INDOL	-	-	-	-
VP	+	+	-	-
RM	-	-	+	+
SIM	+	+	-	-
MALONATO	+	+	+	-
TSI	K/K + H ₂ S (+)	K/K (-)	K/K + H ₂ S (+)	K/K + H ₂ S (+)
UREA	+	+	+	+
LIA	K/K (-)	K/K (-)	K/K (-)	K/K (-)
CITRATO	+	+	+	+

ANEXO E. Prueba del Modelo Aditivo Lineal

$$Y_{01}=u+T_0+e_{01}$$

$$Y_{02}=u+T_0+e_{02}$$

$$Y_{03}=u+T_0+e_{03}$$

$$Y_{11}=u+T_1+e_{11}$$

$$Y_{12}=u+T_1+e_{12}$$

$$Y_{13}=u+T_1+e_{13}$$

$$Y_{21}=u+T_1+e_{21}$$

$$Y_{22}=u+T_1+e_{22}$$

$$Y_{23}=u+T_1+e_{23}$$

$$Y_{31}=u+T_1+e_{31}$$

$$Y_{32}=u+T_1+e_{32}$$

$$Y_{33}=u+T_1+e_{33}$$

$$Y_{41}=u+T_1+e_{41}$$

$$Y_{42}=u+T_1+e_{42}$$

$$Y_{43}=u+T_1+e_{43}$$

$$e_{01} \quad -347.6$$

$$e_{02} \quad -1174.6$$

$$e_{03} \quad -969.6$$

$$e_{11} \quad -634.3$$

$$e_{12} \quad -855.3$$

$$e_{13} \quad -1002.3$$

$$e_{21} \quad -906.6$$

$$e_{22} \quad -683.6$$

$$e_{23} \quad -901.6$$

$$e_{31} \quad -1128.6$$

$$e_{32} \quad -735.6$$

$$e_{33} \quad -627.6$$

$$e_{41} \quad -1246.9$$

$$e_{42} \quad -385.9$$

$$e_{43} \quad -858.9$$

ANEXO F. Formula del Medio Mínimo de Sales de Davis

Cuadro 54. Composición para 1L de medio mínimo de sales.

COMPUESTOS	CANTIDAD
Fosfato de potasio dibásico	5.23 g/L
Fosfato de potasio monobásico	1.91 g/L
Sulfato de magnesio	0.009 mL
Sulfato de amonio	1 g/L
Solución traza de elementos	1 mL

Cuadro 55. Composición para 1L de la solución traza de elementos

COMPUESTOS	CANTIDAD
Cloruro de cobalto	20 mg/L
Ácido bórico	30 mg/L
Sulfato de cobre	10 mg/L
Molibdato de sodio	1 mg/L
Sulfato de hierro	10 mg/L
Sulfato de magnesio	2.6 mg/L
Agua destilada	1000 mL



Figura 18. Peso de la muestra



Figura 19. Preparación de la muestra



Figura 20. Siembra del cultivo en el agar



Figura 21. Crecimiento en los medios de cultivos de la muestra de suelo



Figura 22. Conteo de microorganismos en el agar Plate Count

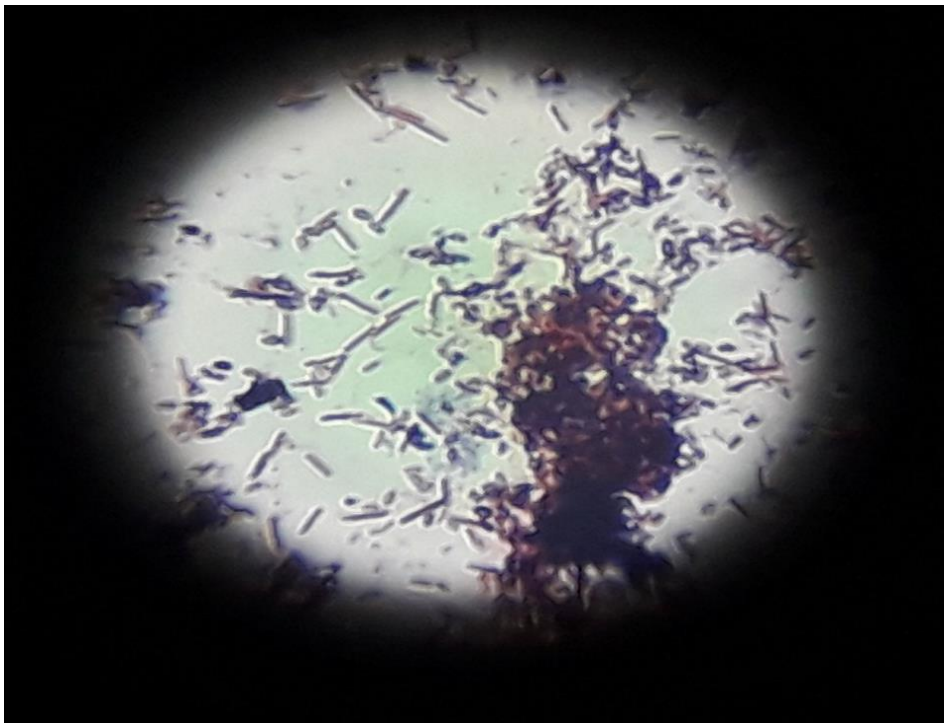


Figura 23. Observación del *Bacillus* sp. en el microscopio

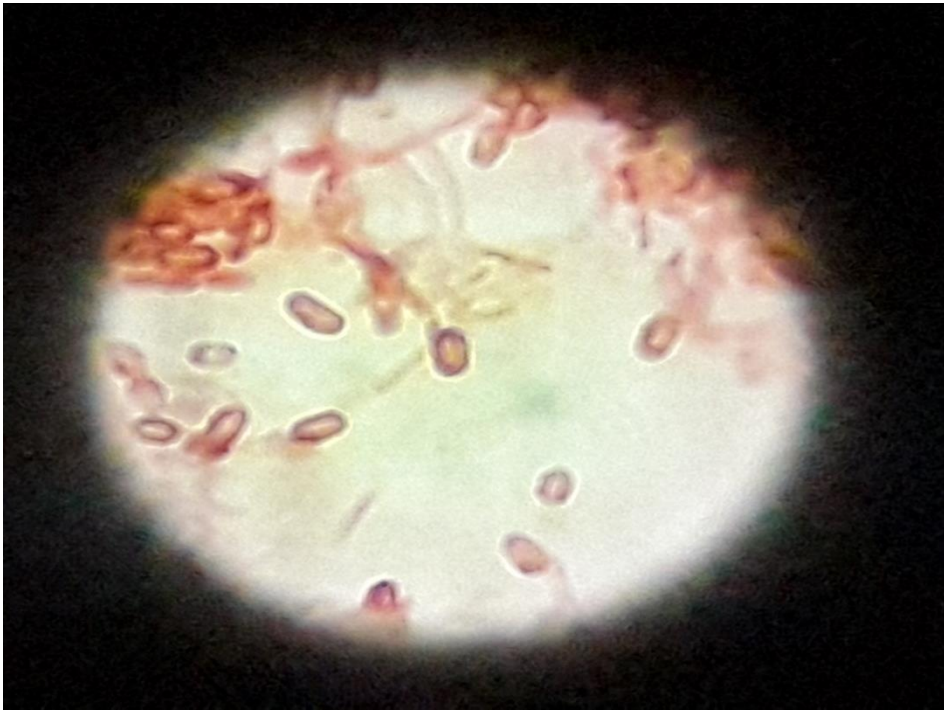


Figura 24. Observación del *Bacilos sp.* en el microscopio



Figura 25. Prueba bioquímica de las bacterias encontradas

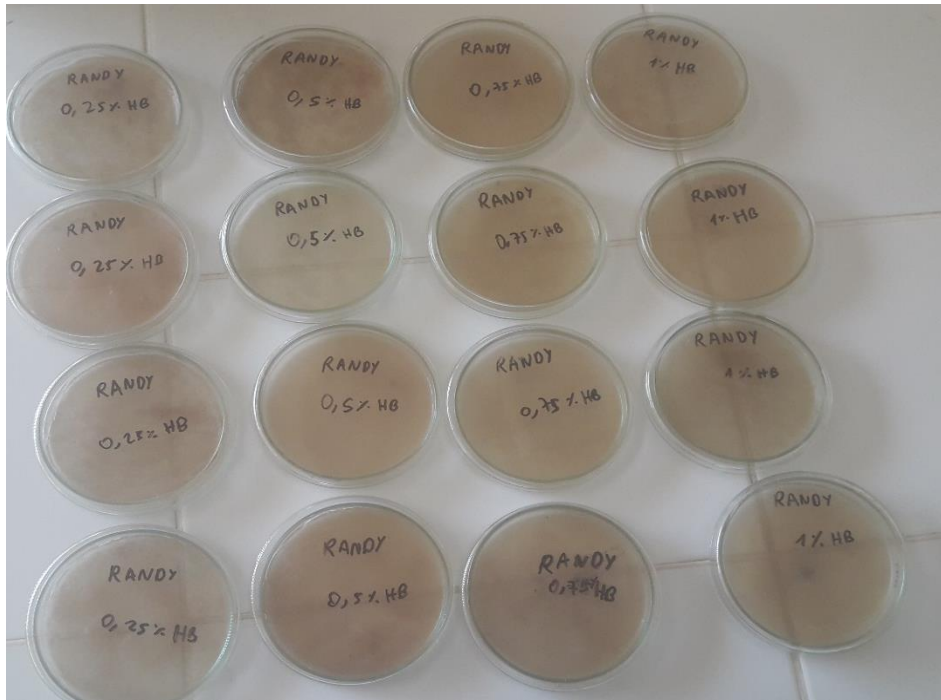


Figura 26. Crecimiento de las bacterias en el Agar Mínimo de Sales Minerales de Davis



Figura 27. Inicio del proceso de operaciones en los biorreactores



Figura 28. Mediciones del pH de los biorreactores



Figura 29. Mediciones del OD y °T de los biorreactores



Figura 30. Observación del biofilm en el biorreactor



Figura 31. Observación del crecimiento de microorganismos del biorreactor

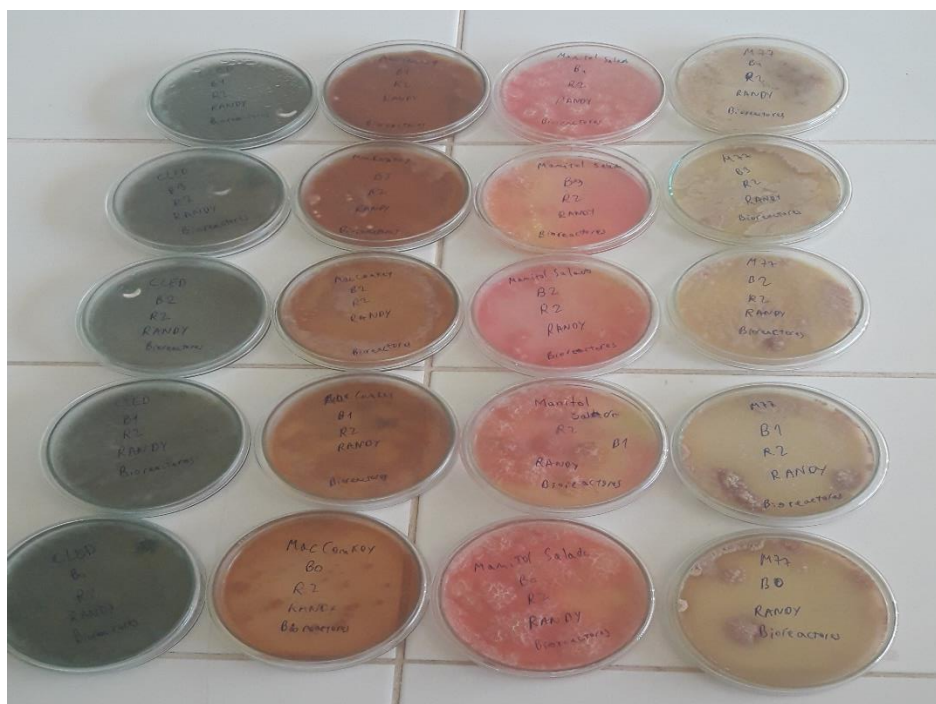


Figura 32. Observación del crecimiento de microorganismos de los biorreactores en los agares para su selección

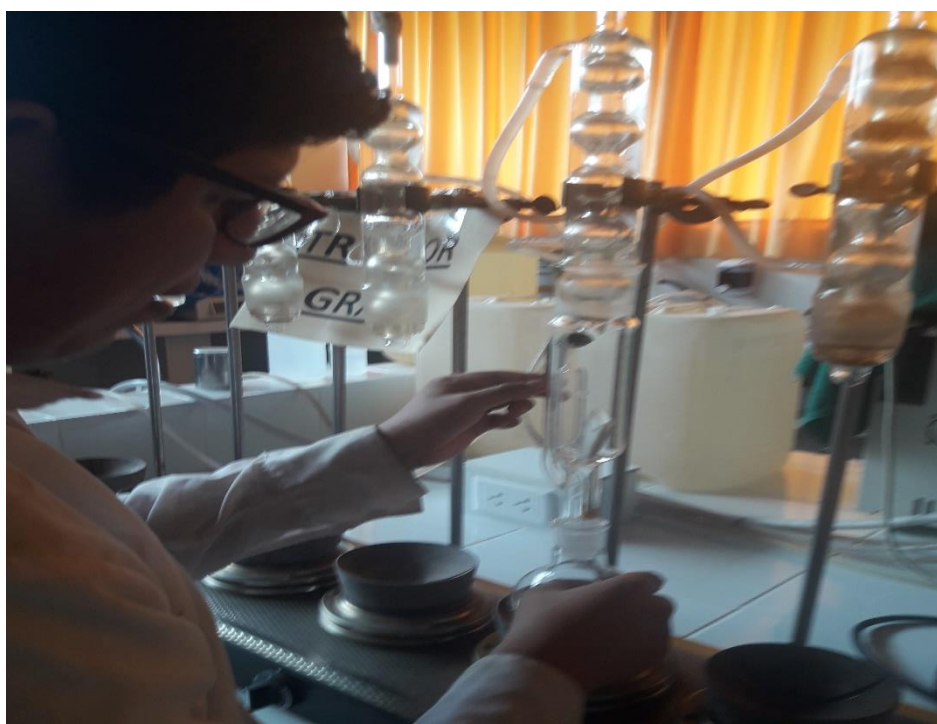


Figura 33. Prueba de determinación del hidrocarburo total de petróleo por el soxhlet

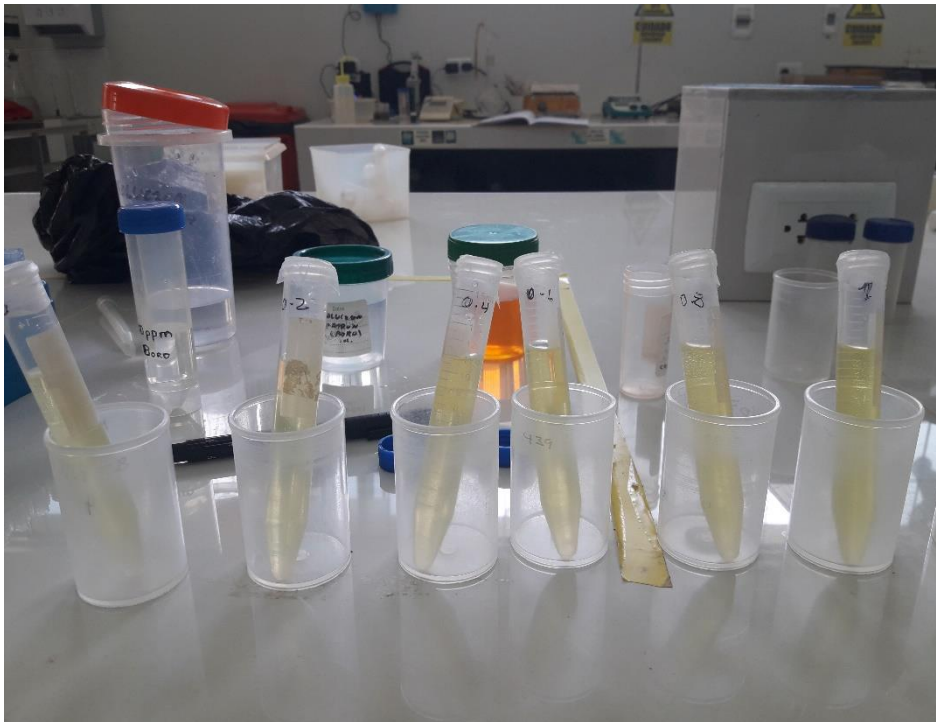


Figura 34. Prueba de análisis del boro del suelo



Figura 35. Análisis para determinar la prueba de moteados y consistencia



Figura 36. Prueba de la permeabilidad y conductividad hidráulica del suelo



Figura 37. Prueba para la determinación del color del suelo en la tabla Munsell



Figura 38. Extractos de muestras de los biorreactores en operación del día 15