

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA  
ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN AGROECOLOGIA  
MENCIÓN GESTION DE SUELOS Y AGUA



BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON  
HIDROCARBURO MEDIADA POR *Pseudomonas spp.* EN  
BIORREACTORES.

Tesis

Para optar el Grado Academico de:

MAESTRO EN AGROECOLOGIA MENCIÓN GESTIÓN DE  
SUELOS Y AGUA

IMER WAN CHANG HUAYASCO

Tingo María – Perú

2020



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
**ESCUELA DE POSGRADO**  
**DIRECCIÓN**



"AÑO DE LA UNIVERSALIZACIÓN DE LA SALUD"

**ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS**

**Nro. 016-2020-EPG-UNAS**

En la ciudad universitaria, siendo las 06:06 pm, del día viernes 23 de octubre del 2020, reunidos virtualmente vía Microsoft Team, se instaló el Jurado Calificador a fin de proceder a la sustentación de la tesis titulada:

**“BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBURO  
MEDIADA POR *Pseudomonas* sp. EN BIORREACTORES”**

A cargo del candidato al Grado de Maestro en Ciencias en Agroecología, mención Gestión de Suelos y Agua de nombre **Imer Wan Chang Huayasco**.

Luego de la exposición y absueltas las preguntas de rigor, el Jurado Calificador procedió a emitir su fallo declarando la tesis **APROBADA** con el calificativo de **MUY BUENO**.

Acto seguido, a horas 7:40 pm. el presidente dio por culminada la sustentación; procediéndose a la suscripción de la presente acta por parte de los miembros del jurado, quienes dejan constancia de su firma en señal de conformidad.

.....  
Dr. César López López  
Presidente del Jurado

.....  
M. Sc. José D. Lévano Crisóstomo  
Miembro del Jurado

.....  
Dr. Lucio Manrique de Lara Suarez  
Miembro del Jurado

.....  
M. Sc. Nelino Florida Rofner  
Asesor

## DEDICATORIA

mis padres César y Julia;  
por darme la vida, ayudarme  
a salir adelante y su apoyo  
incondicional.

A Deysi, mi compañera de  
Vida, y su apoyo y motivación a  
seguir adelante.

A los docentes y compañeros de estudios  
que juntamente con ellos hemos podido  
culminar la maestría.

## **AGRADECIMIENTO**

A DIOS, por darme esta gran oportunidad y por acompañarme en todo momento.

A los docentes de la Escuela de Posgrado de la UNAS, por contribuir en mi especialización profesional.

Al Ing. Msc. Nelino Florida Rofner, asesor del presente trabajo de investigación científica, por su aporte durante el trabajo de investigación.

A mis jurados de tesis de maestría: Dr. César, López López; Ing. Msc. José Lévano Crisóstomo; Dr. Lucio Manrique de Lara Suarez; por sus oportunas sugerencias.

Al Ing. Richard Sias, por su apoyo en la ejecución de la tesis y sus oportunas sugerencias en el desarrollo del mismo.

A las personas que directa e indirectamente aportaron en el planteamiento del problema, en el desarrollo, ejecución y sustentación de la tesis.

## INDICE TEMATICO

I. INTRODUCCION.....	1
Objetivo general.....	2
Objetivos Específicos.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1. COMPOSICIÓN DEL PETRÓLEO EN CRUDO.....	3
2.1.1. COMPOSICIÓN DE FORMA TOTAL .....	3
2.1.2. COMPOSICIÓN POR FAMILIAS DE HIDROCARBUROS.....	4
2.1.3. COMPOSICIÓN DEL CRUDO SEGÚN EL ORIGEN .....	4
2.2. ANTECEDENTES DE ESTUDIOS SOBRE LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS (CRUDO DE PETRÓLEO) .....	5
2.2.1. USO DE CEPAS AISLADAS EN LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS.....	5
2.2.2. UTILIZACIÓN DE CULTIVOS MIXTOS PARA LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO.....	5
2.2.2.1. CONSORCIOS DEFINIDOS .....	6
2.2.2.2. CONSORCIOS NO DEFINIDOS.....	6
2.3. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.....	6
2.3.1. BIODEGRADACIÓN DE HAPS.....	6
2.3.2. MICROORGANISMO DEGRADADORES DE HAPS .....	7
2.3.3. UTILIZACIÓN DE INÓCULOS NO NATIVOS EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN.....	8
2.4. EL SUELO .....	10
2.4.1. EL SUELO SUS COMPONENTES Y ESTRUCTURA.....	10
2.4.2. LAS POBLACIONES MICROBIANAS.....	11
2.4.3. COLOCACION AMBIENTAL DE LOS CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN EL SUELO. ....	11

2.5. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA BIORREMEDIACIÓN DE UN SUELO.....	12
2.5.1. LA TEMPERATURA (T°), EL pH, Y LA HUMEDAD .....	12
2.5.2. BIODISPONIBILIDAD.....	13
2.6. PSEUDOMONAS.....	14
2.6.1. METABOLITOS DE PSEUDOMONAS DE USO BIOTECNOLÓGICOS.....	14
2.6.2. BIODEGRADACIÓN Y BIORREMEDIACIÓN .....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN .....	16
3.2. MATERIALES Y EQUIPOS.....	16
3.2.1. DE CAMPO .....	16
3.2.2. DE LABORATORIO.....	16
3.2.2.1. MATERIALES .....	16
3.2.2.2. EQUIPOS.....	17
3.2.2.3. INSUMOS .....	17
3.2.2.4. REACTIVOS .....	17
3.3. METODOLOGÍA .....	17
3.3.1. UNIDADES DE ESTUDIO .....	17
3.3.2. OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS EN EL SUELO .....	17
3.3.2.1. PREPARACIÓN DEL SUELO PARA EXTRACCIÓN DE HIDROCARBURO .....	18
3.3.2.2. EXTRACCIÓN DE HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO.....	18
3.3.2.3. CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBURO (HTPS) .....	18
3.4. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL SUELO.....	20
3.4.1. TEXTURA DEL SUELO.....	20

3.4.2.	PH DEL SUELO .....	21
3.4.3.	HUMEDAD DEL SUELO EN PORCENTAJE .....	21
3.5.	AISLAMIENTO DE PSEUDOMONAS.....	21
3.6.	CONCENTRACIÓN DE SUELO PARA BIORREMIAR.....	22
3.7.	INSTALACIÓN DE LOS BIORREACTORES .....	22
3.8.	DATOS A RECOLECTAR EN EL SISTEMA.....	23
3.8.1.	DETERMINACIÓN DEL PH EN LOS BIORREACTORES .....	23
3.8.2.	RECuento DE MICROORGANISMOS (BIOMASA) .....	23
3.8.3.	OXÍGENO DISUELTO (OD) EN EL SISTEMA .....	23
3.8.4.	TEMPERATURA (T°C) EN LA OPERACIÓN .....	24
3.8.5.	RENDIMIENTO Y EFICIENCIA DE LA BIORREMEDIACIÓN.....	24
3.9.	VARIABLES E INDICADORES.....	24
3.9.1.	VARIABLE INDEPENDIENTE .....	24
3.9.2.	INDICADOR DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE.....	24
3.9.3.	VARIABLE DEPENDIENTE .....	25
3.9.4.	INDICADOR DE LA VARIABLE DEPENDIENTE .....	25
3.10.	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	25
IV.	RESULTADOS.....	27
4.1.	TEXTURA, PH Y LA HUMEDAD EN PROCENTAJE DEL SUELO UTILIZADO.....	27
4.2.	AISLAMIENTO DE <i>pseudomona spp.</i> .....	27
4.3.	PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO PRESENTES EN EL SUELO AL INICIO, A LOS 7 DÍAS Y A LOS 14 DÍAS DE LA BIORREMEDIACIÓN.....	27
4.4.	PRUEBA ESTADÍSTICA, EVALUACIÓN DE LA PRUEBA TUKEY CON 0.05 GRADO DE SIGNIFICANCIA, PARA LOS RESULTADOS DE PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN.....	29

4.5. UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS PRESENTES EN EL SISTEMA AL INICIO, A LOS 7 DÍAS Y A LOS 14 DÍAS DE LA BIORREMEDIACIÓN.....	30
4.6. PRUEBA ESTADÍSTICA, EVALUACIÓN DE LA PRUEBA TUKEY CON 0.05 GRADO DE SIGNIFICANCIA PARA LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC).....	31
4.7. EVALUACIÓN INICIAL, A LOS 7 DÍAS Y 14 DÍAS, DE LA TEMPERATURA, PH Y OXÍGENO DISUELTO DE CADA BIORREACTOR CON SU RESPECTIVO TRATAMIENTO. ....	33
V. DISCUSIÓN.....	37
VI. CONCLUSIONES.....	39
VII. RECOMENDACIONES. ....	40
VIII. BIBLIOGRAFÍA .....	41

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Crudo de petróleo y su Composición de las fracciones químicas. ....	4
Cuadro 2. Estudios de biorremediación de suelos y agua con contaminante, con éxito en la utilización de inóculos exógenos.....	8
Cuadro 3: Promedio de % de degradación, según días de evaluación respecto a los inóculos utilizados. ....	27
Cuadro 4. prueba tukey realizada al porcentaje de degradación de hidrocarburos presentes en el suelo de cada tratamiento y del testigo.....	29
Cuadro 5. Unidades Formadoras de colonias, según días de evaluación respecto a los inóculos utilizados.....	30
Cuadro 6. prueba tukey realizada al resultado de las unidades formadoras de colonias de cada tratamiento y del testigo. ....	32
Cuadro 7. resultados de la evaluación de pH, Oxígeno disuelto (OD) y Temperatura (T°), del tratamiento testigo. ....	33
Cuadro 8. resultados de la evaluación de pH, Oxígeno disuelto (OD) y Temperatura (T°), del tratamiento que se agregó 20 mL. De inóculo de <i>Pseudomonas spp.</i> ....	33
Cuadro 9. resultados de la evaluación de pH, Oxígeno disuelto (OD) y Temperatura (T°), del tratamiento que se agregó 40 mL. De inóculo de <i>Pseudomonas spp.</i> ....	33
Cuadro 10. resultados de la evaluación de pH, Oxígeno disuelto (OD) y Temperatura (T°), del tratamiento que se agregó 80 mL. De inóculo de <i>Pseudomonas spp.</i> .....	34

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo aeróbico de HAPs.....	7
Figura 2. Se aprecia la distribución de los componentes del suelo.....	10
Figura 3. porcentaje de degradación de hidrocarburo de petróleo, al inicio, a los 7 días y a los 14 días, con tratamiento testigo, 20 ml, 40 ml, 80 ml; de inóculo de <i>Pseudomonas spp</i> .....	29
Figura 4. Unidad formadora de colonias, al inicio, a los 7 días y a los 14 días, con tratamiento testigo, 20 ml, 40 ml, 80 ml; de inóculo de <i>pseudomonas sp.</i>	31
Figura 5. Valores de pH de todos los tratamientos por día de evaluación. ....	35
Figura 6. Valores de oxígeno disuelto (OD), de todos los tratamientos por día de evaluación.....	35
Figura 7. Valores de temperatura (T°) en grados centígrados (°C), de todos los tratamientos por día de evaluación.....	36

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación fue ejecutado con el objeto de evaluar el efecto que va a causar la aplicación de *Pseudomonas spp.*, en diferentes dosis, en un suelo que fue contaminado con hidrocarburo, para biorremediarlo. En esta investigación se el suelo a usado fue proporcionado por la empresa PETROLEOS DE LA SELVA (EX MAPLE GAS), al cual se le determinaron sus características tales como textura, pH y porcentaje de humedad. Se ha empleado la metodología de la extracción de hidrocarburos de suelos mediante soxhlet; se mezcló todo el suelo para homogeneizarlo y luego mediante el método antes indicado se cuantificó en promedio la cantidad de hidrocarburo que contenía el suelo antes del proceso de biorremediación; posteriormente se aisló cepas de *Pseudomonas spp.* Presentes en este suelo para su uso en el proceso de biorremediación, luego se utilizó 100 gramos de suelo ya con el contaminante (Hidrocarburo) para cada tratamiento y para tres repeticiones, a los cuales se le agregaron dosis de *Pseudomonas spp.* (20 mL, 40 mL y 80 mL). Los biorreactores para su funcionamiento en el sistema debían de contener: glucosa en medio mínimo de sales, y se realizó la toma de datos a los 1 día, 7 días y 14 días luego de dar inicio al sistema de biorremediación. Se aplicó ANVA a la información obtenida y también test HDS de tukey obteniendo las siguientes conclusiones. Al que agregar un microorganismo como la *Pseudomona spp.* que también se encuentra presente en el mismo suelo contaminado, brinda un mejor proceso de degradación de hidrocarburos de petróleo. El suelo con el contaminante con el que se trabajó presenta una textura, franco arcillo arenoso, un pH de 6 y 25% de humedad. La presencia de las colonias de *Pseudomonas spp.* fueron disminuyendo según avanza el tiempo y esto se hizo notorio en los tratamientos donde existe mayor eficiencia de degradación de hidrocarburos totales de petróleo, esto hace suponer que, a menor presencia de hidrocarburos totales de petróleo o en su defecto a menor biodisponibilidad de este, menor presencia habrá de unidades formadoras de colonias de *Pseudomonas spp.*

## ABSTRACT

The current research work was carried out with the objective of evaluating the effect that will be created from the application of different doses of *Pseudomonas spp.* in the bioremediation process of soil that was contaminated with hydrocarbon. In this research the soil that was used was provided by the company, PETROLEOS DE LA SELVA (EX MAPLE GAS), for which the characteristics such as texture, pH and moisture percentage were determined. A Soxhlet extractor was used for the extraction of hydrocarbons from the soil methodology; the soil was mixed in order to homogenize it and later with the previously mentioned method the average quantity of hydrocarbon in the soil was quantified before the bioremediation process. After this, strains of *Pseudomonas spp.* present in the soil were isolated in order to use them in the bioremediation process and then 100 grams of soil contaminated with hydrocarbon was used for each treatment and there were three repetitions to which doses of *Pseudomonas spp.* were added (20 mL, 40 mL and 80 mL). In order for the bioreactors to function in the system they had to contain glucose in a minimal salt medium and the data was recorded on days one, seven and fourteen, after the start of the bioremediation system. An ANOVA was done with the information that was obtained as well as Tukey's HSD (HDS in Spanish) test, which obtained the following conclusions. Adding a microorganism such as *Pseudomonas spp.*, which also is found to be present in the contaminated soil, presents a better degradation process for the hydrocarbon from petroleum. The contaminated soil that was used presented a sandy, frank, clay texture with a pH of 6 and a moisture content of 25%. The presence of *Pseudomonas spp.* colonies diminished as time went on and this was notorious where greater degradation efficiency of the total hydrocarbons from petroleum existed; this causes the supposition that with a lesser presence of total hydrocarbons from petroleum or as a default, at its lower bioavailability, there will be a lesser presence of units that form *Pseudomonas spp.* colonies.

## I. INTRODUCCION

Los suelos con hidrocarburos es una problemática que tienen los países que extraen este compuesto. El sustrato suelo se encuentra siempre variando y está comprobado que sus propiedades químicas, físicas y biológicas, son de vital importancia para que el hidrocarburo sea adsorbido, estas propiedades son la materia orgánica, el pH y la textura del suelo.

El aplicar procesos de biorremediación está siendo considerado como una vía de mayor efectividad en la remediación de suelos contaminados.

La Biorremediación acelera la tasa de degradación natural de hidrocarburos y requiere que sus variables sean controlados tales como nutrientes, humedad y oxígeno.

Este proceso puede aplicarse *In-situ*, o *Ex-situ*. El tratamiento *Ex-situ* de suelos contaminados con hidrocarburos se puede realizar tanto en procesos en fase sólida y en fase lodo sumergida.

Los desarrollos de biorremediación en fase sólida es cuando se aplica un mínimo de agua al sustrato suelo.

Los desarrollos de biorremediación en fase sumergida, es cuando al sustrato suelo se sumerge en agua.

Las acciones que realizan las poblaciones microbianas del mismo sustrato suelo, pueden favorecerse añadiéndose nutrientes, agua, oxígeno y modificando el pH. Así como introduciendo otras especies para incrementar la concentración de la población microbiana presente.

Ante esta mención en párrafos anteriores se plantea la siguiente interrogante: ¿Se biorremediará suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo mediante la utilización de *Pseudomonas spp*??

**Objetivo general**

Determinar la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, mediada por *Pseudomonas spp* en biorreactores.

**Objetivos Específicos**

- Determinar la composición textural, pH y la humedad del suelo en porcentaje del suelo usado en esta investigación.
- Aislar *Pseudomonas spp*. Del sustrato suelo que con anterioridad y de forma natural fue contaminado con hidrocarburo.
- Determinar el porcentaje de degradación de los hidrocarburos.
- Determinación de la concentración de biomasa *Pseudomona spp*. requeridas para la Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. COMPOSICIÓN DEL PETRÓLEO EN CRUDO

#### 2.1.1. COMPOSICIÓN DE FORMA TOTAL

El petróleo en crudo es un líquido negro, viscoso y su composición química es muy compleja, porque puede contener muchos compuestos, como base a amplia variedad de los hidrocarburos (ROSINI, 1960). La variedad que más predomina de la composición de los hidrocarburos (en cincuenta hasta noventa y ocho por ciento de compuesto), motivo por el que son los grupos de contaminantes ambientales de mayor importancia, debido a que abundan y persisten en varios compartimientos ambientales (CASELLAS *et al.*, 1995). En su mayoría son alcanos de cadena lineal (n-alcanos o n-parafinas), y en menor cantidad son alcanos ramificados, ciclo alcanos (o naftenos) y en forma variable los hidrocarburos aromáticos. “Según el dominio de los compuestos tipo hidrocarburo: 84-87% de C, 11-14% de H, de 0-8% de S, y de 0-4% de O y N y de los metálicos como el níquel y el vanadio va a condicionar la composición elemental del crudo (CLARK y BROWN, 1977)”. Sus componentes principales tienen fracciones variadas (cuadro 1):

- i) “fracción con saturación (n-alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas y las ciclo parafinas)”,
- ii) “fracciones aromáticas (mono aromático, di aromáticos e hidrocarburos aromáticos poli cíclicos (HAPs)”,
- iii) “fracción de resinas y iv) fracción de asfaltenos que se encuentran en minoría y son compuestos polares, pudiendo encontrarse hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados y agregados de alto peso molecular (SPEIGHT, 1991)”.

Cuadro 1. Crudo de petróleo y su Composición de las fracciones químicas.

Fracción	Composición
Saturados	<i>n</i> -alcanos, alcanos de cadena ramificados e isoprenoides, y cicloparafinas o cicloalcanos, hopanos.
Aromáticos	Hidrocarburos monoaromáticos, diaromáticos, aromáticos policíclicos (HAP)
Resinas	Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas
Asfaltenos	Agregados de HAP, ácidos nafténicos, sulfuros, ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados.

"Fuente: Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y eco toxicológica, Marc Viñas (2005)".

### 2.1.2. COMPOSICIÓN POR FAMILIAS DE HIDROCARBUROS

El hidrocarburo reúne a los compuestos en las familias siguientes: parafinas volátiles (alcanos ramificados y no ramificados, máximo llega a C10), parafinas no volátiles (estos son los alcanos ramificados y lineales entre C10 - C40), naftenos (ciclo alcanos o ciclo parafinas), oleo finas (alquenos) y aromáticos (mono aromático y poli aromática). Y muy aparte están los componentes de las resinas y los asfaltenos. (Marc Viñas, 2005).

### 2.1.3. COMPOSICIÓN DEL CRUDO SEGÚN EL ORIGEN

Habitualmente es variada el compuesto del crudo dependiendo donde se localiza. Los hidrocarburos que no se pueden degradar tienen alcanos de cadena lineal y ramificada de carbono (C1 a C40 aproximadamente), también ciclo alcanos o naftenos e hidrocarburos aromáticos. Estas fracciones formadas por alcanos tienen su punto de ebullición menor, mientras tanto las composiciones de las fracciones consideradas superiores van a varias dependiendo de la fuente

del petróleo. Cuando un crudo contiene proporciones elevadas de parafinas (n-alcanos y alcanos ramificados) se denomina parafinico o ligero, y pesado o asfáltico si lo que más presenta son naftenos (ciclo alcanos), alcanos que tiene una larga cadena de carbonos (C30-C45) y HAPs (Howe- Grant, 1996). Por ultimo según su lugar de procedencia se tiene crudo que son parafinicos o asfálticos.

## **2.2. ANTECEDENTES DE ESTUDIOS SOBRE LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS (CRUDO DE PETRÓLEO)**

### **2.2.1. USO DE CEPAS AISLADAS EN LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS.**

Como el crudo de petróleo es muy complejo en su composición y sus derivados, esto indica que para conseguir degradar el crudo de petróleo se necesita de una variada capacidad enzimática. Las investigaciones realizadas en su mayoría fueron realizadas con cepas particulares o en mezcla de varias cepas (SOLANAS *et al.*, 1984). En mayor parte degradan alcanos, porque los alcanos son los que se encuentran en mayor abundancia en el crudo de petróleo. Hay casos en que estas cepas pueden oxidar de forma selecta las series alquílicas de ciertos Hidrocarburos. Existen resultados anteriores en donde se usaron la cepa *Pseudomonas spp.* F21, aislada en medio mineral con un hidrocarburo de Arabia lo cual reafirma lo dicho con anterioridad; la cepa F21, es una cepa que puede destruir todos los n-alcanos y los alcanos ramificados que tienen un peso molecular bajo (isoprenoides ligeros), y a la vez tiene la capacidad de degradar de forma selecta (BAYONA *et al.*, 1986; SOLANAS *et al.*, 1984).

### **2.2.2. UTILIZACIÓN DE CULTIVOS MIXTOS PARA LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO**

La utilización de cultivos mixtos es una alternativa de solución, pero se debe definir si serán consorcios definidos o no definidos según sus capacidades

de degradar hidrocarburos y de complementarse entre sí. (CASELLAS *et al.*, 1998).

#### **2.2.2.1. CONSORCIOS DEFINIDOS**

Los consorcios denominados definidos tienen ciertas desventajas. Lo primero es necesario muchas cepas con distintas características para que la degradación del hidrocarburo sea extensa, esto porque los componentes presentes son muchos y el espectro metabólico de cada cepa es limitada. Una desventaja más es que en el proceso intermedio del metabolismo se pueden crear productos tóxicos para las cepas usadas (CASELLAS *et al.*, 1998).

#### **2.2.2.2. CONSORCIOS NO DEFINIDOS**

Estos se obtienen cuando se enriquecen muestras ambientales donde se ha producido anteriormente contaminación por hidrocarburos. La población microbiana existente es una población que se ha formado de forma natural al estar expuestos en el contaminante y esto da una mayor eficiencia en un proceso de biorremediación de compuestos que para ellos ya son conocidos. Es decir que en los consorcios no definidos ya de forma natural están seleccionado microorganismos degradadores de los productos finales de los procesos metabólicos (GRIFOLL *et al.*, 1995).

### **2.3. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS**

#### **2.3.1. BIODEGRADACIÓN DE HAPS**

Existen microorganismos que se encargan de suprimir los HAPs en medios terrestres y acuáticos, por lo que se considera que la degradación microbiana es el principal proceso de degradación del contaminante HAPs. Por lo que es necesario tener la capacidad de conocer y controlar este proceso para utilizarlo en estudios de biorremediación (WHISE, 2000).

En la figura 1. se puede apreciar cómo reacciona una transformación aeróbica de los HAPs. Se originan los metabolitos solubles para ser eliminados (proceso de detoxificación) (CERNIGLIA, 1984; CERNIGLIA *et al.*, 1985).

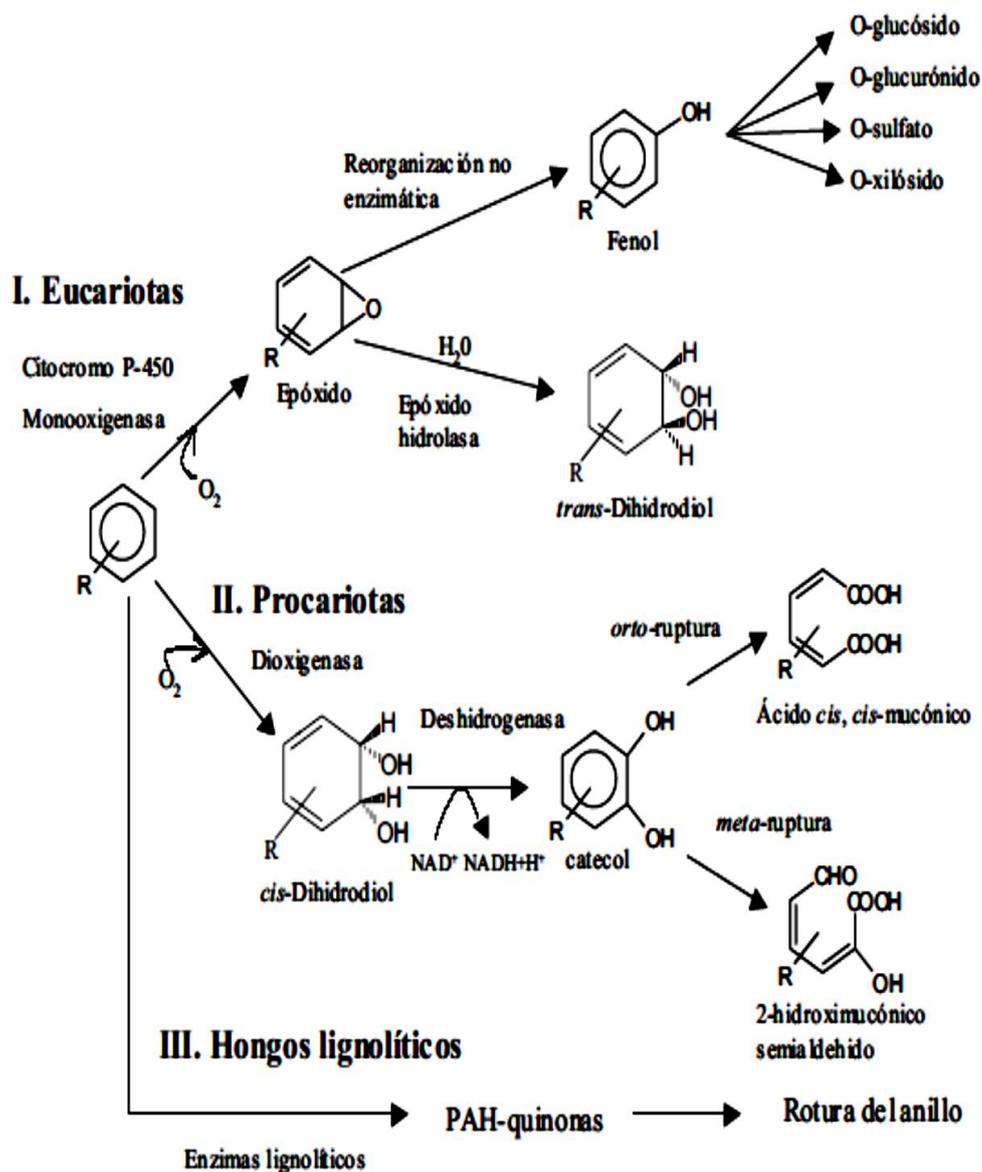


Figura 1. Metabolismo aeróbico de HAPs.

### 2.3.2. MICROORGANISMO DEGRADADORES DE HAPS

Existen gran variedad de bacterias y hongos que pueden degradar los compuestos aromáticos que tiene de 2 a 5 anillos.

“Se han descrito una gran variedad de géneros bacterianos degradadores de HAPs que incluyen: *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paenibacillus*, *Porphyrobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Vibrio* y *Xanthomonas*, según MARC VIÑAS (2005)”.

### **2.3.3. UTILIZACIÓN DE INÓCULOS NO NATIVOS EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN**

La utilización de microorganismos que no son nativos del lugar contaminado pueden como también no pueden lograr descontaminar el suelo (ALEXANDER, 1999). Cuando el contaminante estuvo en el suelo por muchas horas la población nativa actúa eficientemente a los procesos de bioestimulación al aumentar su población. Hay estudios que dan resultados positivos al proceso de bioestimulación en suelos con hidrocarburos (SABATÉ *et al.*, 2004). Existe evidencia en donde el agregar microorganismos en suelos contaminados ha dado buenos resultados tanto en suelos, lodos y aguas subterráneas con contaminantes (VOGEL, 1996).

Cuadro 2. Estudios de biorremediación de suelos y agua con contaminante, con éxito en la utilización de inóculos exógenos.

Inóculo	Contaminante (matriz)	Referencia
<i>Arthrobacter</i> sp.	Isopropil-N-fenilcarbamato (suelo)	(Clark y Wright, 1970)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Paration (suelo)	(Barles <i>et al.</i> , 1979)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Paration (suelo)	(Barles <i>et al.</i> , 1979)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (suelo)	(Kilbane <i>et al.</i> , 1983)
<i>Pseudomonas cepacia</i> BRI6001	2,4-Ácido diclorofenoxiacético (suelo)	(Comeau <i>et al.</i> , 1993)
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	2,4-Ácido diclorofenoxiacético (suelo)	(Daane y Häggblom, 1999)
<i>Flavobacterium</i> sp.	Pentaclorofenol (suelo)	(Crawford y Mohn, 1985)
Lodos anaeróbicos activados	Pentaclorofenol (suelo)	(Mikesell y Boyd, 1988)
Suelo activado	Pentaclorofenol (suelo)	(Barbeau <i>et al.</i> , 1997)
<i>Desulfotobacterium frappieri</i> PCP-1	Pentaclorofenol (suelo)	(Beaudet <i>et al.</i> , 1998)
<i>Akaligenes eutrophus</i> TCP	2,4,6-Triclorofenol (suelo)	(Andreoni <i>et al.</i> , 1998)
<i>Ralstonia basilensis</i> RK1	2,6-Diclorofenol (suelo)	(Steinle <i>et al.</i> , 2000)
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	Atrazina (suelo)	(Shapir y Mandelbaum, 1997)
Consorcio	Atrazina (suelo)	(Alvey y Crowley, 1996)
Consorcio	Atrazina (suelo)	(Grigg <i>et al.</i> , 1997)
Consorcio	Atrazina (suelo)	(Newcombe y Crowley 1999)
<i>Agrobacterium radiobacter</i> J14a	Atrazina (suelo)	(Struthers <i>et al.</i> , 1998)
<i>Escherichia coli</i> (pAtzA)	Atrazina (suelo)	(Strong <i>et al.</i> , 2000)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> EPA505	HAPs (suelo)	(Straube <i>et al.</i> , 1999)
<i>Arthrobacter</i> sp. RP17	HAPs (suelo)	(Singer <i>et al.</i> , 2000)
Consorcio	HAPs (lodos)	(Cardinal y Stenstrom, 1991)
<i>Phanerochaete sordida</i>	HAPs (suelo)	(Lamar <i>et al.</i> , 1994)
<i>Arthrobacter</i> sp B1B	Bifenil policlorado (PCB) (suelo)	(Singer <i>et al.</i> , 2000)
<i>Ralstonia eutrophus</i> H850	Bifenil policlorado (PCB) (suelo)	(Singer <i>et al.</i> , 2000)
<i>Pseudomonas</i> sp. P51	1,2,4-triclorobenceno (suelo)	(Tchelet <i>et al.</i> , 1999)
Consorcio	Crudo de petróleo (lodos)	(Mishra <i>et al.</i> , 2001)
Consorcio	fuel (aguas subterráneas)	(Von Wedel <i>et al.</i> , 1988)
<i>Comamonas testosteroni</i> I2	3-cloroanilina (lodos)	(Boon <i>et al.</i> , 2000)
<i>Comamonas testosteroni</i> BR 60	3-clorobenzoato (suelo)	(Gentry <i>et al.</i> , 2001)
Cepa bacteriana PM1	Metil-tert-butileter (MTBE) (aguas subterráneas)	(Hristova <i>et al.</i> , 2001)
<i>Burkholderia cepacia</i> PR1301	1,1,1-Tricloroetano (aguas subterráneas)	(Bourquin <i>et al.</i> , 1997)

“Fuente: Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica, Marc Viñas (2005)”.

## 2.4. EL SUELO

### 2.4.1. EL SUELO SUS COMPONENTES Y ESTRUCTURA

El sustrato suelo lo compone la capa superficial de la corteza terrestre, y es considerado como un ente dinámico que se originó por elementos de origen mineral (mineralización de las rocas), origen orgánico (humus y sus procedentes, biomasa viva y muerta), gases (aire en los espacios inter partículas), y líquido el cual se encuentra cubriendo a las partículas ocupando los espacios vacíos entre ellos.

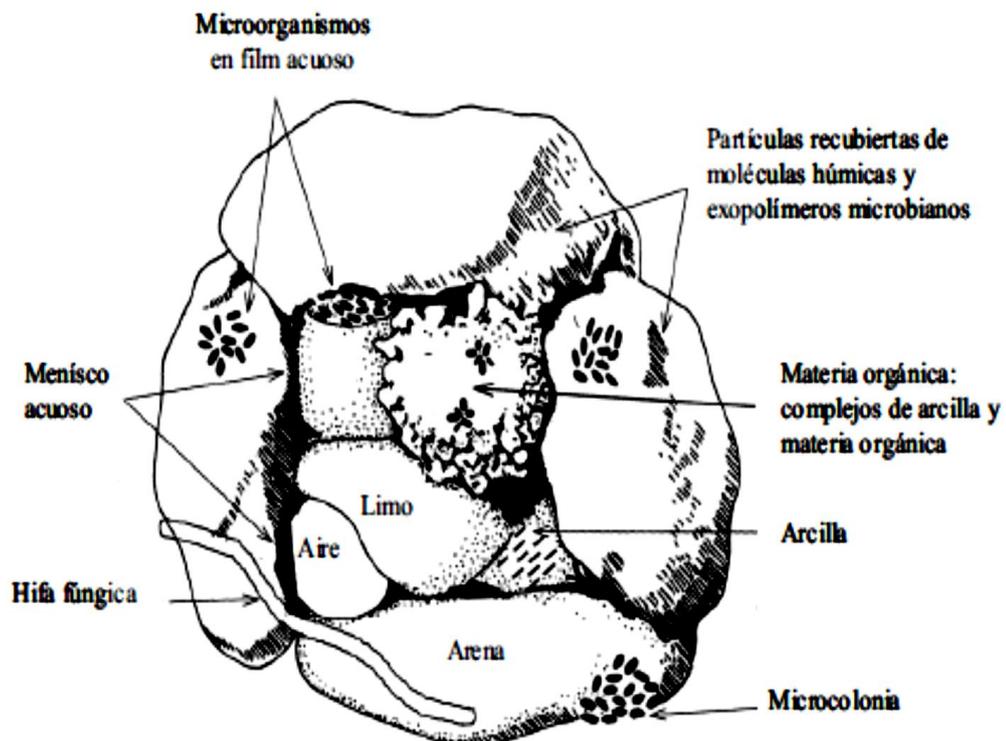


Figura 2. Se aprecia la distribución de los componentes del suelo.

La variedad de suelos está definida por las cantidades de arena (“2-0,05 mm diámetro”), limo (“2-50  $\mu\text{m}$  de diámetro”), y arcilla (“inferior a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro”) y el humus y sus derivados (materia orgánica). La parte mineral y orgánica del suelo forman los espacios que le dan una conformación porosa

(grafico 2). Estos espacios llamados poros pueden contener aire o agua, originando la existencia de la fase sólida, líquida y gaseosa. En el medio líquido del suelo es donde los minerales y nutrientes se encuentran contenidos y es el lugar en donde se desarrolla las actividades de los microorganismos que lo colonizan. El contenido de humedad del suelo puede afectar la actividad microbiana.

#### **2.4.2. LAS POBLACIONES MICROBIANAS.**

Existen entre  $10^6$  -  $10^9$  bacterias que pueden ser cultivadas por cada gramo del sustrato, y junto a las setas representan lo más valioso de toda la biomasa del suelo (ALEXANDER, 1977). Se estima que 0.1 a 1 % de todos los microorganismos pueden ser cultivadas (AMANN *et al.*, 1995). La forma en la que se compone el suelo genera una heterogeneidad por el tipo de sustrato, presencia de nutrientes, la cantidad de oxígeno y la humedad del suelo y el pH variable (LADD *et al.*, 1996). Esta condición permite que existan diversas poblaciones microbianas que están condicionadas por la disponibilidad de fuentes de carbono, energía y al cual también las características físico químicas las condicionan.

En su mayoría las poblaciones microbianas propias del suelo ante un caso de contaminación se van seleccionando a favor de metabolizar el contaminante, y puede ser transformado con rapidez.

Para poder iniciar un proceso de biorremediación se debe identificar si la población que es autóctona tenga el potencial de degradar el contaminante presente para que la biodegradación suceda en un plazo aceptable (WRENN y VENOSA, 1996).

#### **2.4.3. COLOCACION AMBIENTAL DE LOS CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN EL SUELO.**

El suelo al contener las tres fases (sólida, líquida y gaseosa), además de los componentes orgánicos que lo conforman, hacen que el suelo sea muy

complejo. Estas características condicionan la distribución de los contaminantes que son orgánicos. Los contaminantes que son orgánicos pueden fisicoquímicamente ser transformados o ser biodegradados (BOSSERT y BARTHA, 1984).

## **2.5. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA BIORREMEDIACIÓN DE UN SUELO**

Para poder biodegradar el hidrocarburo que se encuentra en el sustrato suelo se debe considerar los factores tales como: la población microbiana presente que tenga el potencial de degradar el contaminante de forma activa, como esta estructuralmente la molécula del contaminante, la cantidad y que tan disponible esta para los microorganismos, además del pH, la temperatura y humedad del suelo, como también si existen receptores de carga negativas disponibles, y también que tan disponible están los nutrientes inorgánicos (Nitrógeno y Fosforo).

### **2.5.1. LA TEMPERATURA (T°), EL pH, Y LA HUMEDAD**

el microorganismo en cepas tiene rango conocido que puede tolerar los factores del medio ambiente como: la temperatura, el pH, quienes intervienen afectando el desarrollo y las acciones de los microorganismos.

Para obtener una mayor amplitud de tolerancia de los microorganismos estos deben ser variados. Condiciones perfectas difícil se va a dar para todos los microorganismos, pero en forma general a pH y temperaturas extremadamente altas o extremadamente bajas y en presencia de salinidad, se va biodegradar de forma lenta. Los rangos perfectos para la biodegradación son: pH entre 6 - 8 y temperaturas entre 20 – 30 °C (ALEXANDER, 1999).

Cuando el pH se mantiene variable este altera la actividad de los microorganismos y a la vez los procesos de solubilización y adsorción/absorción

de los contaminantes y de los iones. Es decir que, el pH neutro (pH 6 - 8) es perfecto para las bacterias heterótrofas VERSTRAETE *et al.* (1976).

Uno de los factores importantes es la temperatura que afecta directamente en la actividad metabólica y la tasa de biodegradación de los microorganismos. La mayoría de estudios indican que las condiciones donde la temperatura es de 20 – 30 °C son considerados como óptimas para la biorremediación de suelos contaminados.

La cantidad de líquido y por ende el porcentaje de humedad del suelo influye severamente en la biodegradación. No obstante, el nivel perfecto de cantidad de líquido y porcentaje de humedad está dependiendo de las propiedades de cada suelo, la contaminación y el proceso de biodegradación en condiciones aeróbica o anaeróbica. El exceso de agua genera que exista insuficiente cantidad o porcentaje de oxígeno disuelto en agua (ALEXANDER, 1999; MENN *et al.*, 2000). DIBBLE Y BARTHA (1979), describen un espacio de porcentaje de humedad perfecto que es del 30 - 90% de su capacidad de campo para el proceso de biodegradación aeróbica de lodos contaminados con crudo de petróleo. Sin embargo, LAJOIE Y STROM (1994) y PRAMER Y BARTHA (1972), recomiendan que el proceso de biorremediación se de en una humedad que se encuentre dentro del 50 y 70% de la capacidad de campo.

### **2.5.2. BIODISPONIBILIDAD**

La relación de traslado, del metabolismo de los microorganismos y del traspaso de masas del compuesto se conoce como biodisponibilidad. Las transferencias de masas es un factor que va a limitar el proceso de biodegradación cuando están propensos a los diferentes compuestos orgánicos. Es decir, el proceso de transferencia de masas depende de la disponibilidad de los compuestos orgánicos biodegradables (ALEXANDER, 1987).

## 2.6. PSEUDOMONAS

El género *Pseudomonas* está representando a un grupo importante y grande de bacterias gran negativas, de ahí es porque es tan importante en el medio ambiente.

la reputación positiva del *Pseudomonas* ha ido mejorando por consecuencia a la mayor cantidad de artículos publicados, de donde se puede apreciar que estos microorganismos poseen la capacidad de degradar compuestos orgánicos del medio ambiente o del sustrato en donde se encuentren. La reputación que tiene se debe a que las *Pseudomonas* usan muchos compuestos que pueden ser intermediarios de caminos conocidos que llevan al metabolismo, sino porque también degradan compuestos aromáticos, derivados halogenados y varios restos orgánicos recalcitrantes que muy difícilmente llegan a ser degradados o si son degradados es por otros conjuntos de microorganismos. (PALLERONI 1992).

### 2.6.1. METABOLITOS DE PSEUDOMONAS DE USO BIOTECNOLÓGICOS

Es bien conocida la obtención de compuestos naturales por medio de procesos de producción biotecnológico a escala industrial a través de cepas de *Pseudomonas*, como es la producción de vitami B12 por *P. denitrificans* (FLORENT, 1986). Este proceso es especialmente eficiente en un medio rico en betaina, como la melaza de remolacha (FA *et al.*, 1984.; KUSEL *et al.*, 1984), aunque la producción de vitaminas B12 por *Pseudomonas spp.* AM-1 mitotrófica a partir de metanol como fuente barata de carbono no ha podido reemplazar al exitoso proceso industrial original (TSUCHIYA y NISHIO, 1980; FLORENT, 1986).

### 2.6.2. BIODEGRADACIÓN Y BIORREMEDIACIÓN

A mediados del siglo pasado la liberación en el medio ambiente de varios productos químicos sintéticos, particularmente compuestos aromáticos clorados, inicio la creciente generación de los problemas de contaminación ambiental,

debido a que no solamente se liberaron compuestos tóxicos y mutagénicos/carcinogénicos, sino también a que persisten en el ambiente por periodos largos llegando a afectar el ecosistema y al hombre. Ejemplo de tales productos químicos tóxicos son el DDT y el herbicida ácido 2,4,5 – triclorofenoxiacético (2,4,5-T o agente naranja). La biorremediación es desintegrar el contaminante orgánico utilizando microorganismos que van a generar dióxido de carbono y agua o metano como compuestos finales. Esto quiere decir que la biorremediación busca degradar los desechos tóxicos a componentes más sencillos y que son poco dañinos al ambiente.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

Esta investigación fue realizada en el LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA que se encuentra dentro de la UNAS, que se ubica políticamente dentro del distrito de Rupa Rupa, de la provincia de Leoncio Prado, de la región Huánuco y tiene una altura de 664 m. sobre el nivel del mar. La temperatura de esta zona varía entre 29,4 °C máximo, 19,2 °C mínimo y 23,9 °C media. humedad relativa de 88 %.

#### **3.2. MATERIALES Y EQUIPOS**

##### **3.2.1. DE CAMPO**

Se usaron pala, Cuaderno y lapicero, envases plásticos y guantes anti fluidos.

##### **3.2.2. DE LABORATORIO**

###### **3.2.2.1. MATERIALES**

“Los materiales usados fueron: cintas masking tape, placas Petri, etiquetas, probetas de 250 ml, mascarillas quirúrgicas, tubos de ensayo de 18 a 180 mm, mandil o guardapolvo, asa de colle, mecheros, matraz de 250 ml, varillas agitadoras, pinzas, tijeras, cartuchos de celulosa o fibra de vidrio, guantes, pipetas de 1 a 10 ml, papel filtro, embudos, gradillas, cintas, pitas, soporte universal, biorreactor, termómetro, vaso de precipitación, matraz de bola, espátula, mortero, papel aluminio, Frascos de vidrio de 30 ml entre otros”.

### **3.2.2.2. EQUIPOS**

“Se utilizaron la estufa, balanza analítica, pH – metro, incubadora, cámara fotográfica, cuenta colonias, cocina eléctrica, equipo de reflujo Soxhlet de 250 ml, autoclave, centrifuga, bombas de aire, refrigeradora, batidora eléctrica y baño maría”.

### **3.2.2.3. INSUMOS**

“Los insumos usados fueron; caldo peptano, medio B.H.I, medio M77, medio Muller Hinton, prueba indol, prueba SIM, prueba Rojo de Metilo, prueba TSI, prueba LIA, prueba A. Citrato, prueba Malonato y prueba Urea”.

### **3.2.2.4. REACTIVOS**

“Los reactivos utilizados fueron: hexametáfosfato de sodio, carbonato de sodio, alcohol amílico, sulfato de sodio anhidro y diclorometano”.

## **3.3. METODOLOGÍA**

### **3.3.1. UNIDADES DE ESTUDIO**

Las unidades en estudio fueron los suelos contaminados con hidrocarburo, que se obtuvieron de la Empresa Petróleos de la selva (ex MAPLE GAS), las muestras que se obtuvieron fueron de aproximadamente 2 Kg que después de mezclarlos; se extraen 100 gramos del sustrato suelo para ponerlos en todos los biorreactores, considerando 3 biorreactores por cada concentración de biomasa microbiana y con tres repeticiones. Asimismo, se consideraron tres biorreactores con sus tres repeticiones para la muestra testigo.

### **3.3.2. OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS EN EL SUELO**

### **3.3.2.1. PREPARACIÓN DEL SUELO PARA EXTRACCIÓN DE HIDROCARBURO**

Se tiene por consideración que las muestras deben ser secas y molidas para tener una homogeneidad en las muestras. Para poder secar el suelo se realizó lo siguiente: Se secó el suelo (100 g) extendida en un papel aluminio a 30°C, por 2 días, en un ambiente con la temperatura controlada o bajo la sombra, luego se muele el suelo en mortero hasta que sus partículas sean finas, por último, la muestra se coloca en un envase limpio y seco.

### **3.3.2.2. EXTRACCIÓN DE HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO.**

Hay una variedad de procesos para extraer hidrocarburos, la que se usó en esta investigación es el método de extracción por reflujo (Soxhlet), teniendo como los siguientes métodos como referencia 3541 de la US EPA (1996, 1994) y 3540C y D5369-93 de la ASTM (2003).

Se debe colocar 10 g de suelo seco y molido en cartucho de celulosa, luego se agrega sulfato de sodio anhidro en la misma proporción del suelo (mismo peso) y combinarlos. Luego los cartuchos ya preparados se ubican dentro del equipo extractor Soxhlet. A continuación se adiciona 125 ml de diclorometano (disolvente) dentro del envase donde se depositará el hidrocarburo extraído y al final se ensambla el equipo Soxhlet para iniciar a calentar el envase hasta obtener una temperatura que permita que el disolvente se evapore. Este sistema se debe mantener por 8 horas seguidas hasta que el disolvente tenga un color claro y transparente. Después de ese tiempo se obtendrá todos los hidrocarburos solubles en diclorometano. Trasladar el envase que contiene el hidrocarburo a una estufa para que el disolvente se evapore por completo.

### **3.3.2.3. CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBURO (HTPS)**

Cuando ya se haya realizado la extracción de hidrocarburos que contenía el suelo, este se puede cuantificar usando una balanza analítica de

laboratorio, ya que es un método recomendado para medir hidrocarburos de muestras aceitosas, como por ejemplo los sustratos con hidrocarburos pesados o muestras que son aguosas y en casos donde se utilice el diclorometano como solvente en el proceso de extracción (US EPA 821-B94-004, 1995).

Se debe tener un peso constante del envase que contendrá el hidrocarburo (matraz de bola para la extracción). Luego se debe poner el envase en la estufa a 120 °C por 4 horas. Luego se retira el material y se ubica en un desecador para que pueda enfriarse. Luego con una balanza analítica se debe obtener el peso del envase, realizar el proceso anterior hasta obtener un peso constante. Apuntar el dato del peso del envase (RA). Cuando ya se tenga el componente orgánico extraído en el envase que tiene peso constante se debe dejar que el solvente usado se evapore por completo en la estufa a 45°C hasta que ya no contenga líquido. Luego volver a pesar el envase con el producto obtenido del proceso de extracción sin el solvente utilizado. Por último, se debe apuntar ese peso (RB).

### **Cálculos**

Se basa en las diferencias que hay en los pesos de contenido de hidrocarburos. Para poder calcular la concentración de hidrocarburos de petróleo en una muestra, se tiene que tener el dato de la cantidad de sustrato suelo que se utilizó, y el dato de la humedad de ese suelo. El resultado se expresa en mg de HTP/Kg de suelo seco, y su cálculo es el siguiente:

$$\text{“HTPs (mg Kg}^{-1} \text{ de s.s.) = (RB – RA) * (FC) / (P * FH)”}.$$

Donde:

- “HTPs (mg Kg<sup>-1</sup> de s.s.) = hidrocarburos totales del petróleo en mg/Kg de suelo seco”.
- “RA= es el peso del envase vacío a un peso constante (mg)”.
- “RB = es el peso del envase con el extracto concentrado (mg)”.
- “P = el suelo usado en gramos (g)”.

- “FH = factor que se usa para la corrección de la humedad (1-(%humedad/100))”.
- “FC = factor que se usa para la corrección y para transformar a kg de s.s. = 1 000”.

### **3.4. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL SUELO**

#### **3.4.1. TEXTURA DEL SUELO**

Se utilizó la metodología de Bouyoucos.

- Se pesa 50 g. del sustrato suelo y se coloca en el vaso que viene con el equipo eléctrico para dispersar.
- Luego se agrega 15 mL de hexametáfosfato de sodio al 10 % y 100 mL de agua destilada.
- Mantener agitando durante 300 segundos.
- Luego del proceso de agitación de la solución, esta se coloca en la probeta de Bouyoucos.
- Luego llenar de agua debidamente destilada hasta lograr llegar a la marca 1130 estando el hidrómetro dentro de la solución.
- Agitar con fuerza utilizando un agitador manual y luego poner a reposar durante 10 segundos para luego proceder a tomar la lectura inicial de la temperatura y densidad con el hidrómetro.
- Habiendo cumplido dos horas se procede a tomar la lectura final de la temperatura y densidad con el hidrómetro.

#### **Calculo**

$$\text{"\% de limo y arcilla} = ((H1 + (T1 - H1) \times 0.36) / 50) \times 100\text{"}$$

$$\text{"\% arcilla} = ((H2 + (T2 - H2) \times 0.36) / 50) \times 100\text{"}$$

Dónde:

- "H1: lectura inicial del hidrómetro"
- "T1: lectura inicial del termómetro"
- "H2: lectura final del hidrómetro"
- "T2: lectura final del termómetro"

### **3.4.2. PH DEL SUELO**

Se determinó mediante el uso del pH-metro:

Obtener 10 gramos de suelo, y mezclar con 10 mL de agua destilada, mantener agitando la solución por dos minutos, y luego de reposar medir pH con el pH-metro.

### **3.4.3. HUMEDAD DEL SUELO EN PORCENTAJE**

Saber la cantidad de agua que puede retener el suelo es necesario e importante para calcular en que cantidad está presente en el sustrato suelo el hidrocarburo.

Se pesa 100 gramos del sustrato suelo con contenido de agua en una balanza analítica, luego se pone a secar ese mismo suelo en la estufa a 45° C de temperatura por dos días.

Luego se obtiene el dato de su peso en una balanza analítica.

#### **Cálculo**

$$\text{"\% humedad} = ((\text{PSH} - \text{PSS}) / \text{PSS}) \times 100\text{"}$$

Donde

- PSH: Suelo con humedad
- PSS: Suelo secado

### **3.5. AISLAMIENTO DE PSEUDOMONAS**

Del mismo suelo usado se aisló la bacteria *Pseudomonas spp.*, lo que ha permitido tener la población microbiana nativa. Luego se pesaron 10 gramos de

suelo. posteriormente se depositó en un envase que contenía agua destilada y Peptona al 0.1 % (90 mL en total). Luego se procedió a filtrar la muestra y se retiró 1 mL de muestra y se aplicó la técnica de diluciones decimales hasta la  $10^{-4}$  teniendo como diluyente a la Peptona 0.1 %. De la última dilución se obtuvo una alícuota de 0.25 mL y esta se colocó en una placa Petri con medio Cetrimida de Sodio y también en otra placa con medio M77 adicionado con Manitol 1 %.

La incubación que se realizó luego fue por 2 días a temperatura del ambiente. Las colonias que se desarrollaron que tienen sospechas de *Pseudomonas spp.* Se repicaron en los medios de Identificación Bioquímica Diferencial Específica tales como Caldo Peptona, Medio Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MRVP), Agar Citrato de Simmons, Triple Azúcar Hierro (TSI), Agra Lisina Hierro (L.I.A), Caldo Malonato y Medio Urea de Christensen, comparando los resultados para el género en la respectiva tabla de identificación.

Las colonias verificadas como *Pseudomonas spp.* se las trasladó a medio de BHI (Caldo Cerebro Corazón) adicionado de Manitol 1 % y se almacenaron hasta su utilización como inóculos conservándolas en refrigeración (4° a 8°C).

### **3.6. CONCENTRACIÓN DE SUELO PARA BIORREMIAR**

Los suelos en estudio con el hidrocarburo o petróleo a concentración de HTPs cuantificada en el ambiente a biorremediar por *Pseudomonas spp.*, se procesaron en una dosis de 100 g/L (gramos del suelo contaminado por litro de volumen de medio de cultivo en le biorreactor, P/V).

### **3.7. INSTALACIÓN DE LOS BIORREACTORES**

Para otorgar las condiciones para que los microorganismos cumplan su función de biodegradación y observar su comportamiento con respecto a las biomasas microbianas aplicadas, se procedió a la instalación de los biorreactores (recipientes de vidrio acondicionados previamente), con capacidad volumétrica de 1 000 mL, se agregaron 700 mL de MMSM. Se adiciono el sustrato suelo en la concentración determinada con anterioridad, en un volumen no mayor del 10 % (P/V) respecto al volumen total del biorreactor. También se

adicionó Glucosa 0.1 %, en un volumen no mayor al 1 % del volumen total de trabajo, como iniciador de desarrollo de los microorganismos.

Se agregaron los inóculos de *Pseudomonas spp.* en concentraciones de 20 mL/L, 40 mL/L y 80 mL/L. A los biorreactores se les acopló bombas de aire de 1.8 L/min para que exista la circulación del aire y poner condiciones aeróbicas, que es muy importante en el desarrollo de los microorganismos usados. Posteriormente se selló de forma hermética cada biorreactor para evitar contaminación exterior.

Se dio inicio al sistema al poner en funcionamiento la bomba aireadora.

### **3.8. DATOS A RECOLECTAR EN EL SISTEMA**

#### **3.8.1. DETERMINACIÓN DEL PH EN LOS BIORREACTORES**

De cada biorreactor se obtuvieron datos al día 1, a los 7 días y a 14 días de operación, muestreando un volumen de 50 mL del cultivo sumergido, utilizando la sonda del pH metro digital EXTECH modelo 407227.

#### **3.8.2. RECUENTO DE MICROORGANISMOS (BIOMASA)**

Se hizo el conteo de la biomasa para determinar su desarrollo en el sistema de Biorremediación instalado. Se tomaron 0.1 mL del medio existente en cada biorreactor y se los sembró por profundidad en medio Plate Count, previas diluciones decimales, este recuento se hizo al día 1, a los 7 días y a los 14 días.

#### **3.8.3. OXÍGENO DISUELTO (OD) EN EL SISTEMA**

Se utilizó medidor de Oxígeno Disuelto (Oxímetro) Portátil HI 9146 HANNA, con el procedimiento de la APHA (2005). Se sumergió la punta de la sonda en el envase con la muestra y se dejó por el tiempo necesario para que tenga lugar el equilibrio térmico entre la sonda y la muestra con un movimiento circular ligero hasta obtener una lectura constante.

### 3.8.4. TEMPERATURA (T °C) EN LA OPERACIÓN

La temperatura se midió al momento de tomar las muestras de los biorreactores con termómetros ambientales marca ROAST debidamente calibrados.

### 3.8.5. RENDIMIENTO Y EFICIENCIA DE LA BIORREMEDIACIÓN

Después de haber realizado las evaluaciones de los suelos tratados en los biorreactores, los contenidos de los biorreactores se llevaron a la centrifuga y los sedimentos se secaron en el horno a 110°C por 4 horas posteriormente se obtuvo la cantidad de hidrocarburos sobrantes.

El rendimiento de la eficiencia en la Biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburo fue determinado considerando los datos de las concentraciones inicial y final del contenido de hidrocarburo de los suelos en estudio aplicando la siguiente relación porcentual.

$$Re = [(C_i - C_f) / C_i] \times 100$$

Donde:

- Re = Rendimiento de eficiencia en porcentaje
- C<sub>i</sub> = Concentración inicial del hidrocarburo en suelo no tratado
- C<sub>f</sub> = Concentración final del hidrocarburo en suelo tratado

## 3.9. VARIABLES E INDICADORES

### 3.9.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

Se tuvo como variable independiente a la bacteria biorremediante *Pseudomonas spp.*, en diferentes concentraciones expresadas en mililitros de cultivo de *Pseudomonas spp.* por volumen de cultivo sumergido agregadas como inóculos en el biorreactor (V/V).

### 3.9.2. INDICADOR DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE

- Inóculos de *Pseudomonas spp.* (mL/L) : 20 mL/L, 40 mL/L, 80 mL/L

### 3.9.3. VARIABLE DEPENDIENTE

La Biorremediación de Suelos contaminados con hidrocarburos, los cuales fueron enfrentados con diferentes concentraciones de *Pseudomonas spp.*

### 3.9.4. INDICADOR DE LA VARIABLE DEPENDIENTE

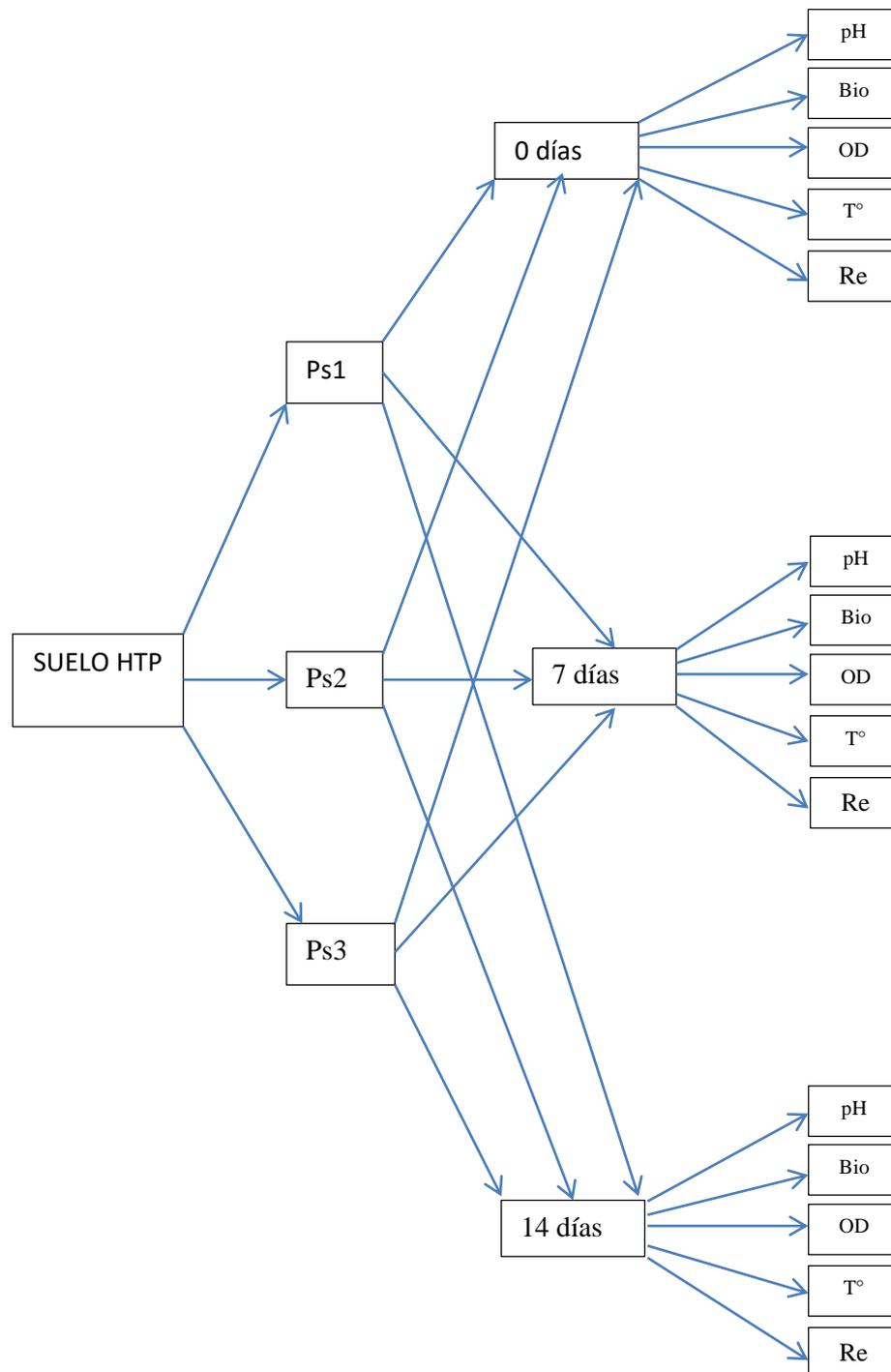
- Hidrocarburo (petróleo) en suelos (g/mL)
- Eficiencia de la Biorremediación (porcentaje: %)

## 3.10. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se aplicó un diseño experimental de estímulo creciente modificando los porcentajes de concentración de los inóculos de siembra de *Pseudomonas spp.*, obteniéndose datos del pH, desarrollo de Biomasa (Bio), Oxígeno disuelto en el sistema (OD), Temperatura en la operación (T°), Rendimiento de la Eficiencia (Re) tanto al inicio, a los 7 días y al término de la operación del sistema (14 días), por cada muestra de suelo.

Por lo tanto, se tuvo un sistema experimental con un suelo contaminado con una concentración de hidrocarburo (S1), tres inóculos de *Pseudomonas spp* (Ps1=20 mL/L, Ps2=40 mL/L y Ps3=80 mL/L), se realizaron tres mediciones (0 días, 7 días y 14 días) para determinar 6 parámetros (pH, OD, Bio, T° y Re). Se llevaron a cabo tres repeticiones.

Dando lugar a 3 tratamientos más un testigo o control, teniendo el siguiente diseño esquemático de trabajo:



**LEYENDA:**

PS1, PS2 y PS3 : inóculos de Pseudomonas de 20 mL/L, 40 mL/L y 80 mL/L respectivamente.  
 OD: Oxígeno disuelto; Bio: biomasa desarrollada;  
 T°: temperatura de operación; Re: Eficiencia biorremediación

## IV. RESULTADOS

### 4.1. TEXTURA, PH Y LA HUMEDAD EN PORCENTAJE DEL SUELO UTILIZADO.

Del procedimiento realizado se obtuvo que la textura que presenta el suelo es de suelo franco arcillo arenoso, (7.13 % de limo, 25.89 % de arcilla y 65.92 % de arena; el pH de este suelo es de 6, y tiene un 25% de humedad.

### 4.2. AISLAMIENTO DE *Pseudomonas spp.*

Se realizó el aislamiento de *Pseudomonas spp.* Presente en el mismo suelo contaminado, los cuales se guardó en cepas, para su posterior uso en tres tipos de concentraciones (20 ml, 40 ml y 80 ml.).

### 4.3. PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO PRESENTES EN EL SUELO AL INICIO, A LOS 7 DÍAS Y A LOS 14 DÍAS DE LA BIORREMEDIACIÓN.

Se determinó los porcentajes de degradación de hidrocarburos, los cuales son los siguientes:

Cuadro 3: Promedio de % de degradación, según días de evaluación respecto a los inóculos utilizados.

DÍAS	INOCULOS	% DEGRADACIÓN
7	0	2.7
7	20	3.44
7	40	4.55

7	80	9.44
14	0	4.22
14	20	9.47
14	40	9.97
14	80	11.19

Fuente: propia

Se puede apreciar en el cuadro 3, que en el día 7 de la evaluación, el tratamiento testigo, el primer tratamiento (20ml.), el segundo tratamiento (40 ml.) y el tercer tratamiento (80 ml.), presentan un porcentaje de degradación de 2.7 %, 3.44 %, 4.55 % y 9.44 % respectivamente.

También se aprecia que en el día 14 de la evaluación, el tratamiento testigo, el primer tratamiento (20ml.), el segundo tratamiento (40 ml.) y el tercer tratamiento (80 ml.), presentan un porcentaje de degradación de 4.22 %, 9.47 %, 9.97 % y 11.19 % respectivamente. Como se puede apreciar en la figura siguiente.

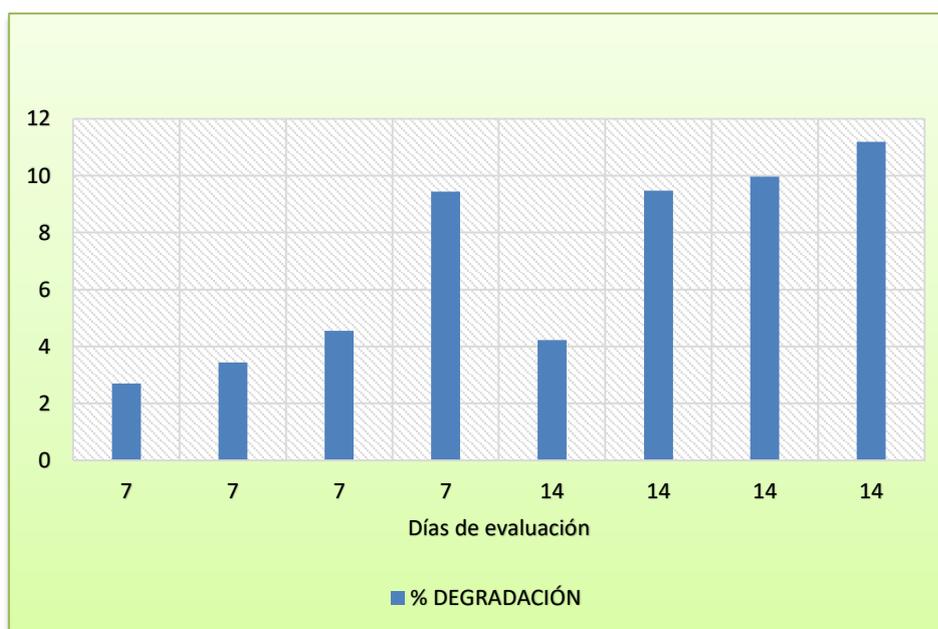


Figura 3. porcentaje de degradación de hidrocarburo de petróleo, al inicio, a los 7 días y a los 14 días, con tratamiento testigo, 20 ml, 40 ml, 80 ml; de inóculo de *Pseudomonas spp.*

#### 4.4. PRUEBA ESTADÍSTICA, EVALUACIÓN DE LA PRUEBA TUKEY CON 0.05 GRADOS DE SIGNIFICANCIA, PARA LOS RESULTADOS DE PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN.

Al realizar la evaluación de la prueba tukey, se obtuvo el siguiente cuadro.

Cuadro 4. prueba tukey realizada al porcentaje de degradación de hidrocarburos presentes en el suelo de cada tratamiento y del testigo.

INOCULOS	DÍAS	% DEGRADACIÓN	
80	14	11.19	A
40	14	9.97	A B
20	14	9.47	B
80	7	9.44	B
40	7	4.55	C
0	14	4.22	C
20	7	3.44	C D
0	7	2.7	D
80	1	0	E
40	1	0	E
0	1	0	E
20	1	0	E

“Medias con letra común, no son significativamente diferentes. (valor alfa 0.05)”

Del cuadro 4, se puede observar que el mayor porcentaje de degradación de hidrocarburos del suelo, se produjo en el tratamiento que se agregó 80 ml. de inóculo de *Pseudomona spp.* En los 14 días.

#### **4.5. UNIDAD FORMADORA DE COLONIAS PRESENTES EN EL SISTEMA AL INICIO, A LOS 7 DÍAS Y A LOS 14 DÍAS DE LA BIORREMEDIACIÓN.**

Referente a la Unidades formadoras de colonias se determinó lo siguiente:

Cuadro 5. Unidades Formadoras de colonias, según días de evaluación respecto a los inóculos utilizados.

<b>DÍAS</b>	<b>INOCULOS</b>	<b>UFC</b>
1	0	1400
1	20	2496
1	40	2869
1	80	4043
7	0	323
7	20	411
7	40	301
7	80	551
14	0	1368
14	20	1104
14	40	3152
14	80	1216

Fuente: propia

Se puede apreciar en el cuadro 5 que, en el día 1 de la evaluación, el tratamiento testigo, primer tratamiento (20ml.), el segundo tratamiento (40 ml.) y

el tercer tratamiento (80 ml.), presentan 1400 UFC., 2496 UFC., 2869 UFC. y 4043 UFC. respectivamente.

También se aprecia que en el día 7 de la evaluación, el tratamiento testigo, el primer tratamiento (20ml.), el segundo tratamiento (40 ml.) y el tercer tratamiento (80 ml.), presentan 323 UFC., 411 UFC., 301 UFC. y 551 UFC. respectivamente.

Y por último se aprecia que en el día 14 de la evaluación, el tratamiento testigo, el primer tratamiento (20ml.), el segundo tratamiento (40 ml.) y el tercer tratamiento (80 ml.), presentan 1368 UFC., 1104 UFC., 3152 UFC., y 1216 UFC., respectivamente. Como se puede apreciar en la figura siguiente.

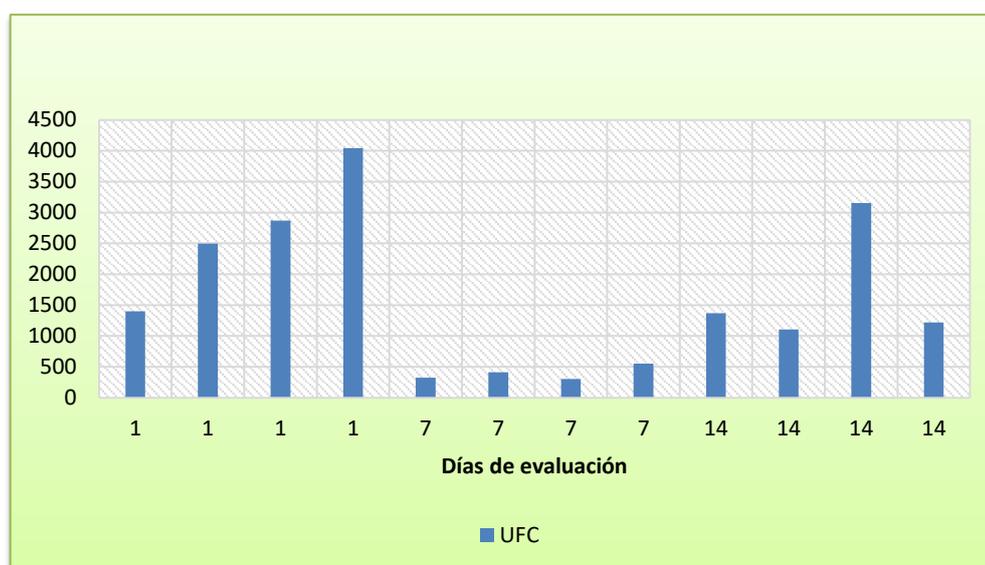


Figura 4. Unidad formadora de colonias, al inicio, a los 7 días y a los 14 días, con tratamiento testigo, 20 ml, 40 ml, 80 ml; de inóculo de *Pseudomonas spp.*

#### 4.6. PRUEBA ESTADÍSTICA, EVALUACIÓN DE LA PRUEBA TUKEY CON 0.05 GRADOS DE SIGNIFICANCIA PARA LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC).

Al realizar la evaluación de la prueba tukey, se obtuvo el siguiente cuadro.

Cuadro 6. prueba tukey realizada al resultado de las unidades formadoras de colonias de cada tratamiento y del testigo.

INOCULOS	DÍAS	UFC				
80	1	4042.67	A			
40	14	3152	B			
40	1	2869.33	C			
20	1	2496	D			
0	1	1400	E			
0	14	1368	E			
80	14	1216	F			
20	14	1104	F			
80	7	550.67	G			
20	7	410.67	G	H		
0	7	322.67	H			
40	7	301.33	H			

“Medias con letra común, no son significativamente diferentes. (valor alfa 0.05)”

Del cuadro 6, se puede observar que existe mayores unidades formadoras de colonias en el tratamiento que se agregó 80 mL. De inóculo de *Pseudomonas spp.* en el primer día de evaluación. De igual forma a los 7 días, pero a los 14 días, el tratamiento que presentó mayores unidades formadoras de colonias fue el que se le agregó 40 mL. De inóculo de *Pseudomonas spp.*

#### 4.7. EVALUACIÓN INICIAL, A LOS 7 DÍAS Y 14 DÍAS, DE LA TEMPERATURA, PH Y OXÍGENO DISUELTO DE CADA BIORREACTOR CON SU RESPECTIVO TRATAMIENTO.

A continuación, se presenta los siguientes cuadros, con los resultados de las evaluaciones de temperatura, pH y oxígeno disuelto.

Cuadro 7. resultados de la evaluación de pH, Oxígeno disuelto (OD) y Temperatura (T°), del tratamiento testigo.

<b>TRATAMIENTO TESTIGO</b>			
<b>VARIABLES</b>	<b>DÍA 1</b>	<b>DÍA 7</b>	<b>DÍA 14</b>
PH	6.93	6.93	7.32
OD	6.44	1.4	1.58
T° (°C)	26.2	25.97	27.23

Fuente: propia.

Cuadro 8. resultados de la evaluación de pH, Oxígeno disuelto (OD) y Temperatura (T°), del tratamiento que se agregó 20 mL. De inculo de *Pseudomona spp.*

<b>TRATAMIENTO 20 mL.</b>			
<b>VARIABLES</b>	<b>DÍA 1</b>	<b>DÍA 7</b>	<b>DÍA 14</b>
PH	7.09	7.21	7.19
OD	5.82	6.43	6.58
T° (°C)	27.5	27.27	28.13

Fuente: propia.

Cuadro 9. resultados de la evaluación de pH, Oxígeno disuelto (OD) y Temperatura (T°), del tratamiento que se agregó 40 mL. De inculo de *Pseudomona spp.*

<b>TRATAMIENTO 40 mL.</b>			
<b>VARIABLES</b>	<b>DÍA 1</b>	<b>DÍA 7</b>	<b>DÍA 14</b>
PH	7.14	7.4	7.29
OD	2.53	6.62	6.27
T° (°C)	27.6	27.93	28.63

Fuente: propia.

Cuadro 10. resultados de la evaluación de pH, Oxígeno disuelto (OD) y Temperatura (T°), del tratamiento que se agregó 80 mL. De inóculo de *Pseudomonas spp.*

<b>TRATAMIENTO 80 ml</b>			
<b>VARIABLES</b>	<b>DÍA 1</b>	<b>DÍA 7</b>	<b>DÍA 14</b>
PH	7.33	8.02	7.90
OD	1.11	1.95	4.91
T° (°C)	28.07	28.27	29.23

Fuente: propia.

En base a estos datos de los cuadros N° 7, 8, 9 y 10; se realizaron las siguientes figuras.

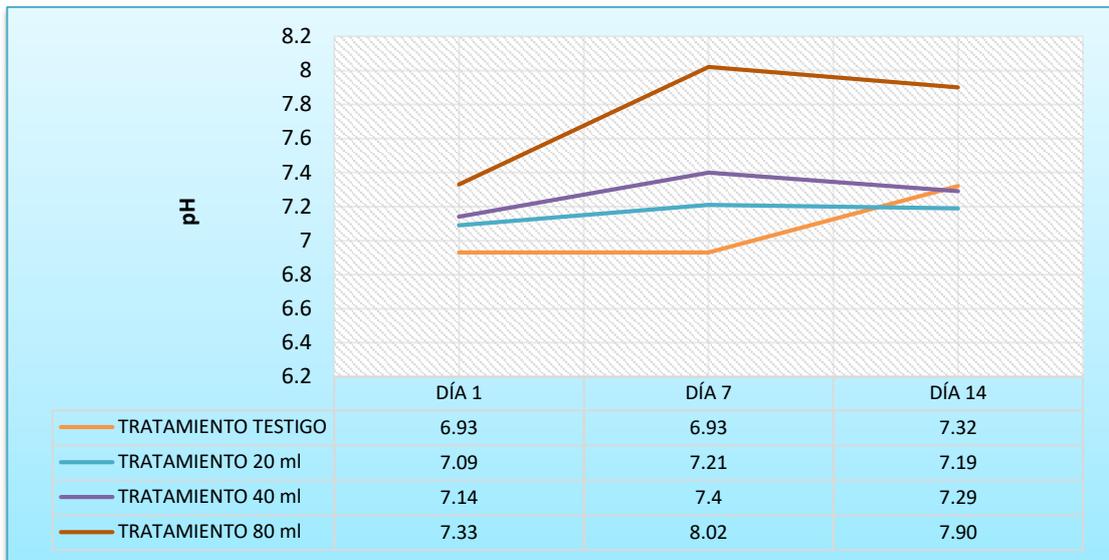


Figura 5. Valores de pH de todos los tratamientos por día de evaluación.

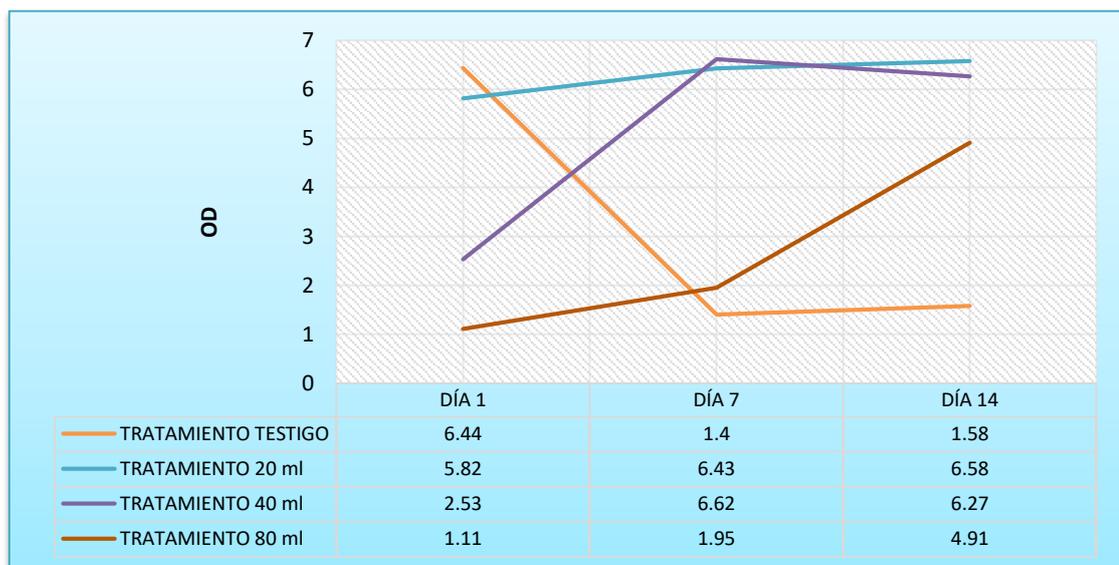


Figura 6. Valores de oxígeno disuelto (OD), de todos los tratamientos por día de evaluación.



Figura 7. Valores de temperatura ( $T^{\circ}$ ) en grados centígrados ( $^{\circ}\text{C}$ ), de todos los tratamientos por día de evaluación.

De las figuras 5, 6 y 7: se obtuvieron como resultado lo siguiente:

El valor de Ph de mayor valor en los tratamientos que se agregaron inóculos de *Pseudomonas spp.* Fueron a los 7 días, a diferencia del tratamiento testigo que fue a los 14 días.

Con respecto al oxígeno disuelto (OD), se aprecia que el mayor valor en el tratamiento testigo fue en el día 1, en el tratamiento donde se agregó 20 ML. De inóculo de *Pseudomonas spp.* Fue en el día 14, del tratamiento donde se agregó 40 ML. De inóculo de *Pseudomonas spp.* Fue en el día 7 y del último tratamiento de 80 mL. De inóculo de *Pseudomonas spp.* Fue en el día 14. Y con respecto a la temperatura en grados centígrados se obtuvieron los mayores valores en el día 14 en todos los tratamientos y aún en el testigo.

## V. DISCUSIÓN.

El suelo utilizado en esta investigación presentó una textura franco arcilloso arenoso, por concepto sabemos que los suelos de las zonas más bajas, son suelos que son productos de un proceso largo de mineralización, esto producto de su exposición a aquellos factores ambientales que han intervenido en su crecimiento y esto es mencionado por ALEXANDER (1999); además en los resultados del porcentaje de humedad, contiene 25%, y según MENN *et al.* (2000), para un suelo con estas características recomienda que debe estar cerca al 60% de la capacidad de campo del suelo.

El pH que tiene el suelo utilizado, es de 6, y esto facilita a la aplicación de un tratamiento de biorremediación como lo indica ALEXANDER (1999), el rango perfecto para poder realizar un proceso de biorremediación es de 6 – 8.

Se utilizó como microorganismo degradador de hidrocarburos totales de petróleo a la especie *Pseudomonas spp.* Esto porque según BALLONA *et al.* (1986) y SOLANAS *et al.* (1984) esta especie se encarga de degradar todos los n-alcanos y los alcanos ramificados de bajo peso molecular (isoprenoides ligeros), y a la vez tiene la capacidad de degradar selectivamente las formas metiladas del nataleno, fenantreno, pireno y criseno. Y también según MARC VIÑAS (2005) las *Pseudomonas spp.* se encuentran dentro de la variedad de géneros bacterianos degradadores de HAPS (hidrocarburos aromáticos polí cíclicos; y esta bacteria se aisló del mismo suelo contaminado esto porque según ALEXANDER (1999) dice que, la población que es nativa va responder de forma eficiente a procesos de bioestimulación, incrementando su población y obteniendo degradaciones significativas de los hidrocarburos.

El adicionar una población microbiana en mayor cantidad como en el caso de nuestra investigación favoreció a la eficiencia en la biodegradación de

hidrocarburos totales que contenía nuestro suelo, este resultado confirma lo dicho por ALEXANDER (1999), el cual dice que, la población que es nativa va responder de forma eficiente a procesos de bioestimulación incrementando su población y logrando que de forma significativa la biodegradación de los hidrocarburos.; y sobre todo el uso de la *Pseudomonas spp.* que según PALLERONI (1992) dice que, La reputación de las *Pseudomonas spp.* es de mucho merecimiento, porque estas en verdad usan varios compuestos que sirven como intermediarios de caminos metabólicos conocidos, y también en su lista esta los compuestos aromáticos, derivados halogenados y varios sobrantes orgánicos recalcitrantes que para degradar son muy difíciles o muy poco degradables.

El aumento o disminución de las unidades formadoras de colonias dependerán mucho de la biodisponibilidad del contaminante, como era de esperarse hubo menor presencia de UFC en el tratamiento que se agregó 80 mL. De inóculo de *Pseudomonas spp.* Y este es el que presentó mayor eficiencia en la degradación de hidrocarburos y al reducir los Hidrocarburos en el día 14 de la evaluación presentó la menor UFC, y según ALEXANDER (1987) la degradación depende de la facultad que tienen para transportar y del metabolismo del microorganismo, como de la transferencia de masas del compuesto, además de que, un factor limitante para el proceso de degradación es la capacidad de transferir las masas, ya que estos microorganismos tienen variadas facultades biodegradativas cuando se exponen a la gran variedad de compuestos orgánicos. es decir que, la presencia de otros microorganismos que degradan ciertos compuestos de los hidrocarburos totales de petróleo, pueden afectar a la biodegradabilidad de los microorganismos adicionados debido a que el contaminante no se encuentra en una composición al cual lo puedan biodegradarlo.

## VI. CONCLUSIONES

1. Agregar un microorganismo como la *Pseudomona spp.* que también se encuentra presente en el mismo suelo contaminado, mejora la eficiencia de la degradación de hidrocarburos de petróleo.
2. El suelo contaminado con el que se trabajó, presenta una textura, franco arcillo arenoso, un pH de 6 y 25% de humedad.
3. La presencia de las colonias de *Pseudomona spp.* fueron disminuyendo según avanza el tiempo y esto se hizo notorio en los tratamientos donde existe mayor eficiencia de degradación de hidrocarburos totales de petróleo, esto hace suponer que, a menor presencia de hidrocarburos totales de petróleo o en su defecto a menor biodisponibilidad de este, menor presencia habrá de unidades formadoras de colonias de *Pseudomona spp.*

## **VII. RECOMENDACIONES.**

1. Realizar investigaciones con diferentes especies de microorganismos presentes en los suelos con hidrocarburos totales de petróleo, realizando una evaluación general; y luego según a que fracciones de hidrocarburos degrada cada especie; y con estos resultados poder conformar consorcios eficientes en la degradación de hidrocarburos de petróleo.
2. Generar cepas de microorganismos degradadores de hidrocarburos a partir de investigaciones realizadas, para tener a nivel nacional y por regiones o tipos de suelos; esto para ser usados en suelos contaminados y cuyo costo podrían ser menores a los que se puedan traer del extranjero.
3. Exigir a las empresas explotadoras de hidrocarburos y a las empresas procesadoras a contar con registro de microorganismos degradadores de hidrocarburos por cada área de influencia y sus respectivos tipos de suelos, con la finalidad de poder realizar eficientemente los procesos de biorremediación, lógicamente en caso extremos, por lo que lo primordial es no afectar al suelo.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

ABALOS, A., M. VIÑAS, J. SABATÉ, M. A. MANRESA Y A. M. SOLANAS. 2004. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas Aeruginosa* AT10. *Biodegradation*. 15:249-260.

ALEXANDER, M. 1999. *Biodegradation and Bioremediation*. Segunda edición. Academic Press, Inc., San Diego

AMANN, R. I, W. LUDWIG Y K. H. SCHLEIFER. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microb. Rev.* 59: 143-169.

BORNEFF, J., F. SELENCA, H. KNUTE Y A. MAXIMOS. 1968. Experimental studies on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in plants. *Environ. Res.* 2:22-24.

CASELLAS, M., P. FERNÁNDEZ, J. M. BAYONA Y A. M. SOLANAS. 1995. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain). *Chemosphere* 30:725-740.

CASELLAS, M., M. GRIFOLL, J. M. BAYONA Y A. M. SOLANAS. 1997. New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. strain F101. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:819-826.

CASELLAS, M., M. GRIFOLL, J. SABATE Y A. M. SOLANAS. 1998. Isolation and characterization of a 9- fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Can. J. Microbiol.* 44:734-742.

CERNIGLIA, C. E., G. L. WHITE Y R. H. HEFLICH. 1985. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hidrocarbons. *Arch. Microbiol.* 143:105-110.

CERNIGLIA, C. E. Y M. A. HEITKAMP. 1989. Microbial of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. En U.Varanasi (Ed.) *Polycyclic*

aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida. pp. 1-45.

FA, Y.H., KUSEL, J.P. and DEMAIN, A.L. "dependence of betain stimulation of vitamin B12 overproduction on protein synthesis", applied and environmental microbiology 47, 1984, 1067-1069.

FLORENT, J. "vitamins" en: biotechnology, H. J Rehm and G. Reed (Eds.). VCH verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania. Vol 4, 1986, pag. 177-158.

KUSEL, J.P., FA, Y.H. and DEMAIN, A.L. "betaine stimulation of vitamin B12 biosynthesis in pseudomonas denitrificans may be mediated by an increase in activity of n-aminolaevulinic acid synthetase", journal of general microbiology 130, 1984, 835-841.

LADD, J. N., R. C. FOSTER, P. NANNIPIERI Y J. M. OADES. 1996. Soil structure and biological activity. Soil Biochem. 9:23-78.

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. pp. 425-439.

PALLERONI, N.J. "Human and animal pathogenic pseudomonas. En: The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification and applications. A. Ballows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (Eds.). Springer-Verlang, Nueva York, 1992, Pag. 662-676.

PALLERONI, N.J. "Pseudomonas classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria", Antonie van Leeuwenhock 64, 1993, 231-251.

ROSINI, F. D. 1960 Hydrocarbons in petroleum. Journal of Chem.Educ. 39:554-561.

TSUCHIYA, Y. AND NISHIO, N. "vitamin B12 production from methanol by continuous culture of pseudomonas AM-1" journal of fermentation technology 58, 1980, 485-487.

WHISE, D. L. 2000. Bioremediation of contaminated soils. Marcel Decker. New York.

WRENN, B. A. Y A. D. VENOSA. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbondegrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42 :252-258.

WHYTE, J.G., HAWARI, J., ZHOU, E., BOURBONNIERE, L., INNIS, W.E. and GREER, C.W. "biodegradation of variable chain length alkanes at low temperatura by psychrotrophic rhodococcus sp.". *applied and environmental microbiology* 64, 1998, 2578-2584.

## **ANEXO**

## PANEL FOTOGRÁFICO



Foto 1: Diluyentes para aislar microorganismos del suelo



Foto 2: Armando los biorreactores con las dosis indicadas en la tesis, para la evaluación posterior.



Foto 3: Biorreactores en funcionamiento para iniciar el proceso de biorremediación mediadas con *Pseudomonas spp.*

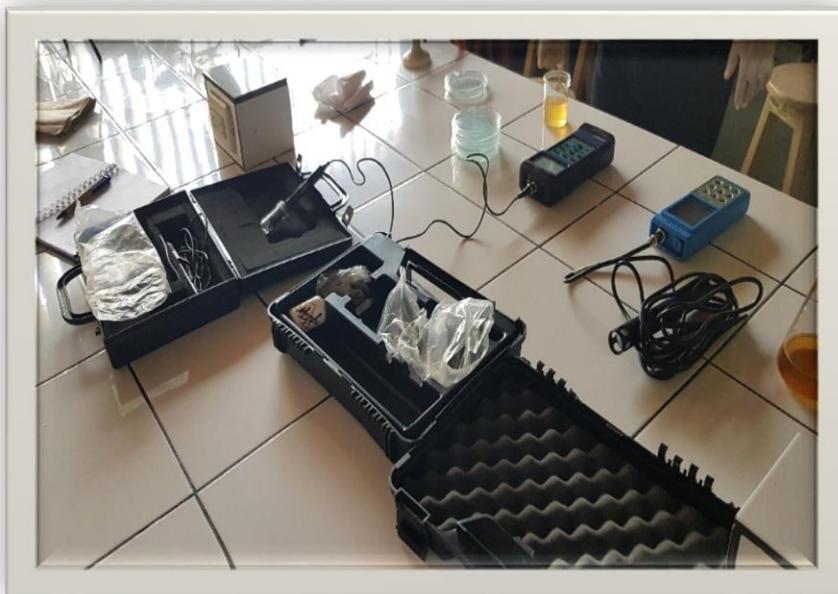


Foto 4: Equipos y materiales a usar en la evaluación y recolección de datos para su análisis estadístico.



Foto 5: Recopilación de datos.



Foto 6: Suelo biorremediador preparándolo para determinar la cantidad de Hidrocarburos totales de petróleo.

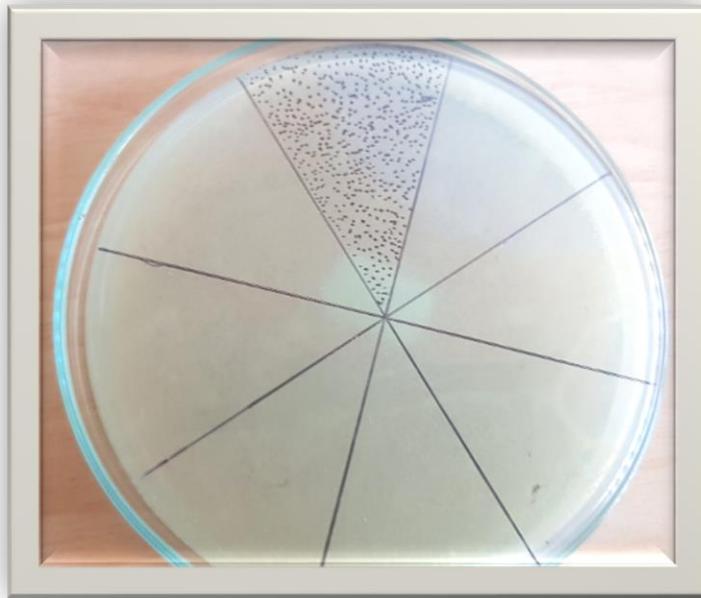


Foto 7: Preparando la placa Petri para realizar el conteo de UFC.



Foto 8: Preparando el suelo para su análisis en el método Soxhlet.



Foto 9: proceso de extracción de HTP con el método Soxhlet.

## DATOS OBTENIDOS PARA LOS RESULTADOS

DÍA 1											
tratamiento testigo 0 ml		tratamiento 20 ml		tratamiento 40 ml		tratamiento 80 ml		tratamiento testigo 0 ml		tratamiento 20 ml	
Ph	6.94	Ph	7.11	Ph	7.17	Ph	7.35	Ph	7.16	Ph	7.22
OD	6.51	OD	5.91	OD	2.52	OD	1.11	OD	1.48	OD	6.67
Temperatura (°C)	27.00	Temperatura (°C)	27.80	Temperatura (°C)	27.80	Temperatura (°C)	28.20	Temperatura (°C)	26.10	Temperatura (°C)	27.30
microorganismos (UFC)	1320.00	microorganismos (UFC)	2568.00	microorganismos (UFC)	2872.00	microorganismos (UFC)	4048.00	microorganismos (UFC)	312.00	microorganismos (UFC)	400.00
matraz e hidrocarburo (mg)	131.31	matraz e hidrocarburo (mg)	126.29	matraz e hidrocarburo (mg)	124.63	matraz e hidrocarburo (mg)	120.12	matraz e hidrocarburo (mg)	137.94	matraz e hidrocarburo (mg)	133.50
peso matraz (mg)	130.32	peso matraz (mg)	125.48	peso matraz (mg)	123.42	peso matraz (mg)	119.05	peso matraz (mg)	136.97	peso matraz (mg)	132.71
HTP (mg/Kg.s.s.)	#####	HTP (mg/Kg.s.s.)	216986.67	HTP (mg/Kg.s.s.)	323333.33	HTP (mg/Kg.s.s.)	285066.67	HTP (mg/Kg.s.s.)	#####	HTP (mg/Kg.s.s.)	209973.33
HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	0.00	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	0.00	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	0.00	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	0.00	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	7760.00	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	7013.33
% DEGRADACIÓN	0.00	% DEGRADACIÓN	0.00	% DEGRADACIÓN	0.00	% DEGRADACIÓN	0.00	% DEGRADACIÓN	2.94	% DEGRADACIÓN	3.23
DÍA 7											
tratamiento testigo 0 ml		tratamiento 20 ml		tratamiento 40 ml		tratamiento 80 ml		tratamiento testigo 0 ml		tratamiento 20 ml	
Ph	7.16	Ph	7.22	Ph	7.49	Ph	8.07	Ph	7.42	Ph	7.22
OD	1.48	OD	6.67	OD	6.64	OD	1.99	OD	1.64	OD	6.61
Temperatura (°C)	26.10	Temperatura (°C)	27.30	Temperatura (°C)	28.00	Temperatura (°C)	28.50	Temperatura (°C)	27.20	Temperatura (°C)	28.00
microorganismos (UFC)	312.00	microorganismos (UFC)	400.00	microorganismos (UFC)	300.00	microorganismos (UFC)	540.00	microorganismos (UFC)	1360.00	microorganismos (UFC)	1080.00
matraz e hidrocarburo (mg)	137.94	matraz e hidrocarburo (mg)	133.50	matraz e hidrocarburo (mg)	133.35	matraz e hidrocarburo (mg)	131.77	matraz e hidrocarburo (mg)	137.90	matraz e hidrocarburo (mg)	133.42
peso matraz (mg)	136.97	peso matraz (mg)	132.71	peso matraz (mg)	132.20	peso matraz (mg)	130.80	peso matraz (mg)	136.95	peso matraz (mg)	132.68
HTP (mg/Kg.s.s.)	#####	HTP (mg/Kg.s.s.)	209973.33	HTP (mg/Kg.s.s.)	306400.00	HTP (mg/Kg.s.s.)	258000.00	HTP (mg/Kg.s.s.)	#####	HTP (mg/Kg.s.s.)	196773.33
HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	7760.00	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	7013.33	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	16933.33	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	27066.67	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	12026.67	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	20213.33
% DEGRADACIÓN	2.94	% DEGRADACIÓN	3.23	% DEGRADACIÓN	5.24	% DEGRADACIÓN	9.49	% DEGRADACIÓN	4.55	% DEGRADACIÓN	9.32
DÍA 14											
tratamiento testigo 0 ml		tratamiento 20 ml		tratamiento 40 ml		tratamiento 80 ml		tratamiento testigo 0 ml		tratamiento 20 ml	
Ph	7.42	Ph	7.22	Ph	7.31	Ph	7.98	Ph	7.42	Ph	7.22
OD	1.64	OD	6.61	OD	6.25	OD	4.91	OD	1.64	OD	6.61
Temperatura (°C)	27.20	Temperatura (°C)	28.00	Temperatura (°C)	28.90	Temperatura (°C)	29.20	Temperatura (°C)	27.20	Temperatura (°C)	28.00
microorganismos (UFC)	1360.00	microorganismos (UFC)	1080.00	microorganismos (UFC)	3200.00	microorganismos (UFC)	1200.00	microorganismos (UFC)	1360.00	microorganismos (UFC)	1080.00
matraz e hidrocarburo (mg)	137.90	matraz e hidrocarburo (mg)	133.42	matraz e hidrocarburo (mg)	133.29	matraz e hidrocarburo (mg)	131.78	matraz e hidrocarburo (mg)	137.90	matraz e hidrocarburo (mg)	133.42
peso matraz (mg)	136.95	peso matraz (mg)	132.68	peso matraz (mg)	132.20	peso matraz (mg)	130.82	peso matraz (mg)	136.95	peso matraz (mg)	132.68
HTP (mg/Kg.s.s.)	#####	HTP (mg/Kg.s.s.)	196773.33	HTP (mg/Kg.s.s.)	292266.67	HTP (mg/Kg.s.s.)	255093.33	HTP (mg/Kg.s.s.)	#####	HTP (mg/Kg.s.s.)	196773.33
HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	12026.67	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	20213.33	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	31066.67	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	29973.33	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	12026.67	HTP (mg/Kg.s.s.)DEGRAD.	20213.33
% DEGRADACIÓN	4.55	% DEGRADACIÓN	9.32	% DEGRADACIÓN	9.61	% DEGRADACIÓN	10.51	% DEGRADACIÓN	4.55	% DEGRADACIÓN	9.32