

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Fundada en 1551
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIDAD DE POST GRADO

Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios

TESIS Para optar el Grado Académico de: **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**
ASESOR: Mg. FERNANDO MERINO RAFAEL
LIMA-PERÚ 2002

..	1
AGRADECIMIENTOS .	3
RESUMEN .	5
ABSTRACT .	7
1. INTRODUCCIÓN .	9
2. ANTECEDENTES: . .	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS .	15
3.1 MATERIALES . .	15
3.2 MÉTODOS .	15
3.2.1 MUESTREO .	15
3.2.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS . .	16
4. RESULTADOS . .	27
4.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS. . .	27
4.2 ACTIVIDAD EMULSIFICANTE DE LAS BACTERIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO. .	28
4.3ACTIVIDAD DEGRADATIVA DE LAS CEPAS BACTERIANAS. . .	29
4.4IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA .	31
4.5 SELECCIÓN DEL CONSORCIO BACTERIANO EXÓGENO. . .	31
4.6 BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS . .	31
4.6.1 REGRESIÓN MÚLTIPLE POR PASOS . .	34
5. DISCUSIÓN .	37
6. CONCLUSIONES . .	41
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .	43
8. ANEXOS .	45
8.1 COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO .	45
8.2 CARACTERÍSTICAS DEL DESTILADO DE CRUDO DE PETRÓLEO A 200 °C . .	47
8.3 CARACTERÍSTICAS DEL SUELO DE CULTIVO. .	50

8.4 BIODEGRADACIÓN DE CRUDO EN TERRARIOS . .	51
8.5 DETERMINACIÓN DE LA REGRESIÓN MÚLTIPLE POR PASOS CON EL PROGRAMA SPSS 9.0 WINDOWS. .	53
ESCALA TURBIDIMÉTRICA MC. FARLAND . .	53

DEDICATORIA *A Nuestro Padre Creador por su divina misericordia. A mis padres Dr. José Angel y María Lila, por haberme guiado con amor y dedicación. A mis hermanos Giovanni, Darío y Fernando, por compartir los momentos más valiosos de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a:

Mg. Fernando Merino por su amable disposición en la asesoría del presente trabajo y por permitir el uso del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Mg. Susana Gutiérrez por su constante ayuda y sugerencias en el desarrollo del trabajo.

Q.F. Fritz Choquesillo por su orientación en la cuantificación de hidrocarburos en suelos.

Blga. Alicia Diestro por brindar las instalaciones del Apiario de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Todas las personas que han contribuido a la culminación del trabajo.

RESUMEN

En Perú se registran derrames de petróleo desde 1978, los cuales contaminan el medio ambiente. Ante este problema surge la biorremediación como alternativa de solución, la cual es el tratamiento biológico de suelos, agua y aire, mediante la biodegradación. En el trabajo se evaluó la biodegradación de crudo de la refinería “La Pampilla” en suelos de cultivo de una zona aledaña a la huaca San Marcos contenidos en terrarios, con la finalidad de determinar la importancia de consorcios bacterianos y factores ambientales en la degradación de hidrocarburos. En una primera etapa, se aislaron bacterias oleofílicas a partir de muestras de suelo de Trompeteros, Iquitos, según el método planteado por Merino, 1998, para seleccionar un consorcio bacteriano de elevada capacidad degradativa (C.D) en laboratorio, la C.D se determinó mediante la prueba de actividad emulsificante (A.E) planteada por Goldman y col. en 1982 y por la prueba de actividad degradativa (A.D) según Mills y col. en 1978. La biodegradación de petróleo se evaluó con la tecnología *Landfarming*, utilizada por Beloso y col. en 1998. El petróleo presentaba 95.77 % de hidrocarburos saturados acíclicos y el suelo de cultivo era fértil franco arenoso con 0.0015 % de Carbono, 2.6% de Nitrógeno, 0.005% de Fósforo y 0.49% de Potasio. Se acondicionaron tres terrarios cada uno con 30 kg de suelo de cultivo contaminado con petróleo. El control abiótico donde se determinó la degradación por factores ambientales, el segundo donde se evaluó la degradación por bacterias nativas y el último donde se inoculó el consorcio bacteriano exógeno seleccionado en laboratorio. Cada treinta días se determinó: hidrocarburos totales, humedad, pH, número de microorganismos aerobios mesófilos, número de microorganismos oleofílicos, temperatura y tiempo. Los terrarios fueron expuestos a la intemperie durante noventa días. Se aislaron cientoventinueve cepas bacterianas, de las cuales, 99.22% presentaron A.E que fluctuó entre 0.75 y 3.66 UAE/mL (unidades de actividad emulsificante) Las cepas bacterianas de mayor A.E fueron: *Pseudomonas aeruginosa* 4k-1, *Bacillus sp.* 6Bh-1 y *Serratia rubidae* 6B9, las que presentaban una A.E de 3.66 UAE/mL, 1.676 UAE/mL y 2.72 UAE/mL respectivamente y una actividad de tres (3+) equivalente a una A.D. buena. En cuanto a la biodegradación, a los noventa días se obtuvo, 92.5 % de degradación en el terrario del consorcio bacteriano exógeno, respecto a 60 % del terrario del consorcio nativo y a 55 % del terrario denominado control abiótico. Según la Regresión múltiple de Stepwise, en la degradación de hidrocarburos, influyeron los microorganismos con un coeficiente estándar del 0.883 y una confiabilidad próxima al 100%. Se concluyó que en suelos de Trompeteros, Iquitos, existen bacterias oleofílicas, con las cuales se puede formar un consorcio bacteriano capaz de degradar significativamente el crudo de petróleo a nivel de terrarios con una confiabilidad próxima al 100 %.

Palabras clave: biorremediación, crudo, huaca, biodegradación, consorcio, saturados acíclicos, oleofílicos, emulsificante, tecnología *landfarming*, terrarios, control abiótico, exógeno, aerobios mesófilos, regresión múltiple de Stepwise, coeficiente estándar, confiabilidad.

ABSTRACT

In Peru, oil spills that pollute the environment were registered since 1978, so the bioremediation was proposed as biological treatment of soil, air and water based on biodegradation. At this work it was tested the crude oil biodegradation of the "La Pampilla" refinery in field soils that were near San Marcos' huaca to determine the activity of microorganisms and environmental factors in hydrocarbon degradation. First, the oleophilic bacteria were isolated from Trompeteros, Iquitos soils with Merino's method, 1998, to select a high degradative capacity bacterial consortium at lab and determine the degradative capacity by the assay of emulsificant activity of Goldman et al., 1982 and the degradative activity of Mills et al. 1978. The crude biodegradation was tested with the *landfarming* technology used by Belloso et al., 1998. The oil had a 95.77% of saturated acyclic hydrocarbons, at the same time the soil used was classified as fertile with a concentration of 0.0015% of Carbon, 2.6% of Nitrogen, 0.005% of Phosphorus and 0.49% of Potassium. It was used three containers each one with 30 kg of field soil polluted with oil: The abiotic control where it was determined the environmental factors biodegradation, the second where it was tested the native bacteria degradation and the last where the exogenous consortium chosen at lab was inoculated. Each thirty days it was quantified: total hydrocarbons, moisture, pH, number of aerobic mesophilic microorganisms, number of oleophilic microorganisms, temperature and time. The soils in the containers were exposed at the environment during ninety days. In the isolation it was found 129 strains, 99.2% had an emulsificant activity since 0.75 until 3.66 UAE/mL, emulsificant activity units. The strains with highest emulsificant activity were: *Pseudomonas aeruginosa* 4k-1, *Bacillus sp.* 6Bh-1 and *Serratia rubidaea* 6B9, which had 3.66 UAE/mL, 1.676 UAE/mL and 2.72 UAE/mL respectively and a degradative activity of three (3+) equal to good activity.

About the biodegradation, after ninety days we obtained 92.5% of biodegradation using the exogenous consortium compared with a 60 % of biodegradation produced by the native consortium and 55 % of degradation in the abiotic control. Besides it was applied the Stepwise Regression Model for the Variables Selection and found that only the microorganisms were important in the biodegradation process, with a standardized coefficient of 0.883 and about 100% of reliability. It was found that there are oleophilic bacteria at Trompeteros, Iquitos' soil, and that it's possible to get a bacterial consortium which is able to oil biodegradation with a reliability of 100 %.

Key words: bioremediation, crude oil, huaca, biodegradation, consortium, saturated acyclic, oleophilic, emulsificant, *landfarming* technology, containers, abiotic control, exogenous, aerobic mesophilic, Stepwise Regression Model, Standardized coefficient, reliability.

1. INTRODUCCIÓN

La industria petroquímica es importante en una sociedad moderna, no obstante la falta de un programa de protección ambiental, hace que el medio ambiente se contamine al producirse derrames de petróleo, principalmente de crudo, por un deterioro de los oleoductos, descargas de efluentes contaminados, afloramientos naturales a través de fisuras de la corteza terrestre y debido a la producción, transporte y almacenamiento de este recurso natural (20).

A nivel mundial, el volumen de derrame de petróleo es de 1.7 a 8.8 millones de toneladas métricas por año (12) y en nuestra región (Pacífico Sudeste) es de 6000 toneladas métricas al año (15) En el Perú se registran derrames de petróleo desde 1978, uno de ellos fue el producido en el oleoducto marino de Talara, hasta uno de los últimos ocurrido el año 2000 en el río Marañón que afectó la Reserva Pacaya-Samiria. Pero no sólo derrames mayores causan contaminación sino también los constantes derrames accidentales en suelos de nuestra selva, los que se producen por el rompimiento del Oleoducto Nor-Peruano, debido a accidentes naturales y por la actividad extractiva (13).

Los dispersantes químicos utilizados para favorecer la remediación de los ambientes contaminados pueden causar un mayor impacto ecológico que el mismo derrame, por su toxicidad y recalcitrancia a la biodegradación (18) Por tanto, una mejor alternativa de solución es el proceso de biorremediación, que es el tratamiento biológico del suelo, aire y agua, mediante la biodegradación de compuestos tóxicos para transformarlos en compuestos de menor o ningún impacto ambiental. Así en la biodegradación de hidrocarburos, se utilizan bacterias con alta capacidad degradativa, entre estas:

Brevibacterium, Spirillum, Xanthomonas, Alcaligenes, Arthrobacter, Nocardia, Flavobacterium, Vibrio, Achromobacter, Acinetobacter, Micrococcus, Pseudomonas aeruginosa, Serratia rubidaea, Bacillus sp., Pseudomonas mendocina, Pseudomonas aureofaciens, etc., las cuales disminuyen la concentración de hidrocarburos presentes en el ambiente y al mismo tiempo son inocuas para la salud y el medio ambiente (3). Estas bacterias producen bioemulsificantes y biosurfactantes que disminuyen la tensión superficial entre el petróleo y el medio acuoso facilitando el acceso microbiano a la fuente de carbono insoluble para su degradación (13).

La finalidad del presente estudio es evaluar la biodegradación de crudo de petróleo en suelos contenidos en terrarios expuestos a la intemperie, los suelos de cultivo proceden de un terreno aledaño a la huaca San Marcos y son contaminados intencionalmente con crudo de petróleo proveniente de la refinería "La Pampilla".

El estudio de la biodegradación a nivel de terrarios nos permite comparar la capacidad degradativa de un consorcio bacteriano nativo y uno exógeno, el primero se refiere a los microorganismos autóctonos presentes en el suelo y el segundo a microorganismos previamente aislados y evaluados en laboratorio, introducidos en el suelo en forma intencional. Además conocer en que medida intervienen en el proceso de biodegradación los factores ambientales.

El trabajo aporta una posible solución a la contaminación por derrames de petróleo, dando inicio a un programa de protección ambiental adecuado.

HIPÓTESIS

En los suelos contaminados con crudo de petróleo procedentes de Trompeteros, Iquitos, existen bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos, a partir de las cuales se puede aislar un consorcio bacteriano capaz de eliminar los hidrocarburos del crudo, a nivel de terrario.

OBJETIVOS

- Aislar cepas bacterianas con capacidad degradativa y emulsificante de petróleo a partir de suelos procedentes de Trompeteros, Iquitos.
- Evaluar la capacidad degradativa de los consorcios bacterianos nativos y exógenos en suelos con crudo de petróleo adicionado intencionalmente, a nivel de terrarios.
- Demostrar que la biodegradación bacteriana de hidrocarburos constituye un mecanismo importante para la recuperación de suelos contaminados con petróleo.
- Reducir la concentración de hidrocarburos en suelos contaminados con crudo de petróleo utilizando un consorcio bacteriano exógeno.

2. ANTECEDENTES:

Sabirova, en el 2000, en Rusia, realizó un estudio en el cual primero aisló microorganismos halotolerantes a partir del suelo contaminado, luego hizo un ensayo previo en laboratorio cultivando los microorganismos aislados en un medio que contenía una mezcla de hidrocarburos y cloruro de sodio. Después de comprobar la tolerancia a las sales, inoculó el consorcio microbiano halotolerante en el suelo contaminado, evaluando a su vez un control abiótico. Después de un mes de haber introducido la comunidad halotolerante en el suelo, la concentración de hidrocarburos disminuyó a un 22 % y al cabo de cinco meses a un 50%. En cambio en el control abiótico, la disminución en la concentración de hidrocarburos fue de 22% al cabo de ocho meses. Sabirova concluyó que en el suelo existen numerosos factores que pueden limitar el número y la actividad de los microorganismos en el suelo. Entre ellos está la salinidad, la cual ha demostrado tener un fuerte efecto inhibitorio sobre microorganismos autóctonos y en la tasa de degradación de petróleo en suelos. Sin embargo la inoculación de microorganismos halotolerantes adaptados a altas concentraciones salinas aumentan significativamente la tasa de degradación del petróleo en el suelo.

Díaz y col., en 1999, en México, evaluaron la biodegradación de hidrocarburos por un consorcio microbiano de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam. Primero sembraron el consorcio microbiano en un medio mineral líquido que contenía hidrocarburos (35 000 ppm) como única fuente de carbono y energía, luego lo incubaron a 30 °C en agitación a 125 r.p.m. durante treinta y cuatro días con su control respectivo, al cabo de ese tiempo cuantificaron la concentración de hidrocarburos, obteniendo una biodegradación del 62.28%.

Arenas, en 1999, en Lima, aisló 262 cepas bacterianas, a partir de muestras de suelo y agua de la refinería "La Pampilla", de las cuales se seleccionaron 55 cepas bacterianas, que fueron las de mayor actividad emulsificante, a las cuales se les evaluó su actividad degradativa. El 100 % crecieron sobre el petróleo y mostraron crecimientos comparables a las escalas dos, tres, cuatro y cinco de Mc. Farland. Los microorganismos aislados fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas aureofasciens*, *Listonella damsela*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus brevis*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter calcoaceticus var. Anitratus*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Sphingobacterium multivorum*, *Staphylococcus Sp.*, *Neisseria Sp.*, *Micrococcus sp.*

Merino, en 1998, en Lima, realizó el estudio de microorganismos nativos productores de emulsificantes de petróleo aislando microorganismos a partir de muestras de suelo y agua procedentes de la refinería "La Pampilla" y evaluando la capacidad degradativa de la mismas mediante la actividad degradativa y emulsificante y concluyó que existe un elevado porcentaje de microorganismos nativos con capacidad de degradar hidrocarburos de petróleo y de producir emulsiones de este producto en agua en ambientes contaminados, y que los microorganismos con mayor capacidad degradativa fueron *Pseudomonas aeruginosa KT1-1* y *Serratia rubidae II BT5-4*.

Rentería y Miranda, en 1998, en Trujillo, realizaron el aislamiento y selección primaria de microorganismos capaces de utilizar petróleo como única fuente de Carbono. Ellos evaluaron el crecimiento sobre petróleo de noventa cepas bacterianas provenientes de muestras de agua y suelo contaminadas con petróleo crudo, cinco cultivos mostraron mayor actividad: *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium*, los que fueron evaluados a través de los parámetros cinéticos velocidad específica de crecimiento y tiempo generacional.

Tantaleán y Altamirano, en 1998, en Ica, realizaron el aislamiento y evaluación del crecimiento de *Pseudomonas spp.* hidrocarburoclásticas en petróleo diesel 2 (D2) y compararon el crecimiento de tres cultivos puros y uno mixto de *Pseudomonas sp.* nativas que tuvieron la mayor capacidad para utilizar el petróleo D2. La mejor capacidad de biodegradación de petróleo D2 se logró en el cultivo mixto.

Belloso y col., en 1998, inocularon suelos *landfarming* con tres tipos de cepas bacterianas: W1,W2,W3 aisladas del mismo suelo contaminado y propagadas en el laboratorio. Ellos aplicaron dos tipos de fertilizantes de tipo NPK(Nitrógeno, Fósforo y Potasio): Z1 con una relación C/N (Carbono - Nitrógeno) de veinte, la relación NPK: 20:2:1, fuente de Nitrógeno NH₄ (amonio) y Z2 con una relación C/N 100, la relación NPK: 20:20:1, fuente de Nitrógeno NH₄ y mantuvieron los suelos a la intemperie durante noventa días. Ellos observaron una mayor reducción en la concentración de hidrocarburos en los primeros treinta días, la cual fue 45 % en uno de los terrarios, que contenía la cepa W2 y fertilizante Z2. El porcentaje de degradación en el terrario control abiótico fue 8 %, mientras que el terrario que contenía el consorcio nativo, presentó un porcentaje de biodegradación del 12 %.

Sirvins y Tramier, en 1993, afirmó que en la isla de Embiez, se ha evaluado la eliminación de hidrocarburos mediante varias pruebas en medio natural, utilizando el

nutriente INPOL EAP 22 en estanques de 16 m³, alimentados con agua de mar, en las pruebas se hicieron variar algunos parámetros como el tipo de hidrocarburo, el grosor de la capa de petróleo o la cantidad de hidrocarburo contaminante. Los resultados demostraron que la adición del nutriente INPOL EAP 22, hizo aumentar la tasa de eliminación del petróleo hasta el 62-70%, la cual en ausencia de este nutriente llegó sólo a 14-20%.

Leahy y Colwell, en 1990, según varias publicaciones de estudios taxonómicos sobre los géneros de cepas bacterianas degradadoras, aisladas de suelos y aguas marinas, concluyeron que los géneros más importantes de bacterias degradadoras son: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* y *Pseudomonas sp.*

Hayes y col., en 1986, indicaron que existen microorganismos productores de emulsificantes como *Acinetobacter calcoaceticus* el cual produce un bioemulsificante de elevado peso molecular, denominado emulsan que fue clasificado como un lipoheteropolisacárido polianiónico.

Atlas, en 1983, afirmó que los géneros más importantes de microorganismos degradadores de hidrocarburos son: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*, todos estos microorganismos fueron aislados de ambientes acuáticos.

Dibble y Bartha, en 1979, realizaron un estudio del efecto de los parámetros ambientales en la biodegradación del crudo de petróleo y analizaron la humedad, el pH, los nutrientes minerales, los micronutrientes, suplementos orgánicos, tasa de tratamiento, frecuencia de tratamiento y la temperatura de incubación. La degradación de crudo de petróleo fue óptima a una humedad del 30-90%, un pH de 7.5 a 7.8, una concentración de C:N y C:P de 60:1 y 800:1, respectivamente, y a una temperatura de 20 °C. El porcentaje de degradación después de ciento ochenta días fue 57 %.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

- Medios de cultivo (Ver anexos 8.1, Pág. 39)
- Suelo contaminado con crudo de petróleo, procedente de Trompeteros, Iquitos.
- Suelo de cultivo, procedente de una zona aledaña a la huaca San Marcos.
- Petróleo crudo procedente de la refinería “La Pampilla”.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 MUESTREO

- a) Muestreo de suelos para el aislamiento de microorganismos con capacidad degradativa.

Se obtuvieron seis muestras de aproximadamente 1 kg de suelo contaminado con crudo de petróleo, procedentes de la zona de Trompeteros, Iquitos y fueron llevadas al laboratorio en bolsas de polietileno etiquetadas, para realizar el aislamiento de microorganismos oleofílicos.

b) Muestreo de suelos para evaluar la biodegradación de crudo en terrarios.

Se obtuvieron tres muestras de 30 kg de suelo de cultivo de alfalfa procedente de una zona aledaña a la huaca San Marcos, para determinar la biodegradación en terrarios. Cada muestra de 30 kg fue introducida en un terrario y una vez contaminada con crudo de petróleo intencionalmente, de cada terrario se tomaron muestras de aproximadamente 1 kg en el tiempo inicial y cada treinta días durante noventa días, para determinar: hidrocarburos totales, humedad, pH, número de microorganismos aerobios mesófilos, número de microorganismos oleofílicos, temperatura y tiempo.

3.2.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

3.2.2.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS.

Se obtuvieron muestras de suelo de 1kg de una zona contaminada con crudo de petróleo de Trompeteros, Iquitos, para aislar cepas bacterianas por el Método de aislamiento de bacterias degradadoras y emulsificantes de petróleo utilizado por Merino en 1998. Para lo cual se suspendieron cinco gramos de suelo en 25 mL de solución salina estéril al 0.85% y a partir de la suspensión se sembró en 25 mL de medios de pre-enriquecimiento: Caldo Palleroni y Caldo Acetato Mineral, ambos medios se incubaron a 30° C con agitación constante a cincuenta revoluciones por minuto durante setenta y ocho horas. Al cabo de ese tiempo, se sembró por estría en agar King-B a partir de caldo Palleroni y en agar Cerebro Corazón (BHI) a partir de caldo Acetato Mineral, se incubó a 30 °C por veinticuatro a cuarenta y ocho horas, posteriormente se aislaron colonias de las diferentes placas, tomando en cuenta su morfología de crecimiento y la procedencia de la muestra. Las colonias seleccionadas se resembraron para su purificación en tubos que contenían 2 mL de caldo nutritivo. Cada colonia fue rotulada. Transcurridas las cuarenta y ocho horas de incubación, para verificar la pureza de las cepas bacterianas se procedió a sembrar por estría en Agar nutritivo, incubando a 30°C por 48 horas.

Después se seleccionaron las colonias aisladas y se sembraron en viales por triplicado conteniendo agar nutritivo en plano inclinado, se volvió a incubar a 30 °C por 48 horas. Una vez observada la pureza de las cepas bacterianas, se procedió a taponar los viales con tapones de goma estériles y a sellar con parafina. El cepario fue mantenido en refrigeración a 4° C hasta que se realizaron las pruebas de capacidad degradativa.

3.2.2.2 ACTIVIDAD EMULSIFICANTE DE LAS BACTERIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO.

Se realizó según la metodología propuesta por Goldman y col. (1982) Se procesaron

ciento veintinueve cepas bacterianas aisladas de seis muestreos, para evaluar la capacidad que tienen de producir emulsificantes de petróleo en agua. Se empleó el Medio Mínimo de Goldman. (Ver anexos, Pág 41), al cual se le adicionó extracto de levadura al 3% P/V (peso sobre volumen) Se utilizó petróleo crudo, proporcionado por la refinería "La Pampilla". Se esterilizó el medio a

121 °C por quince minutos, excepto el etanol, el cual fue agregado posteriormente en condiciones de esterilidad.

Las cepas bacterianas se reactivaron en 2 mL de caldo Nutricio y se les incubó a 37 °C por veinticuatro horas. Luego se repartió en matraces de 100 mL, 18 mL de medio Mínimo con Extracto de Levaduras al 3 %. Se adicionó después los 2 mL de cultivo. Los matraces se incubaron a 30 °C por setenta y ocho horas en agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a centrifugar el cultivo a 5000 r.p.m por treinta minutos.

Se obtuvieron 10 mL del sobrenadante en tubos de prueba de 16 x 150 mm, previa decantación, luego se le agregó a cada tubo con sobrenadante 0.2 mL de petróleo crudo y se agitó manualmente por cinco minutos (esto facilitó la posible producción de una emulsión) Se trasvasaron 5 mL, de la preparación anterior a tubos de Spectronic de 13 x 100 mm. para la lectura de la absorbancia a 540 nm. de longitud de onda en el Espectrofotómetro "Spectronic 20D" Milton-Roy.

El blanco fue un tubo conteniendo el medio de cultivo sin inoculación, y se procedió de la misma manera que con las otras muestras.

La absorbancia leída se convirtió en unidades de actividad emulsificante por mililitro (UAE/mL), siendo 0.816 de absorbancia equivalente a una unidad de actividad emulsificante por mililitro.

3.2.2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEGRADATIVA DE LAS CEPAS BACTERIANAS.

La actividad degradativa sobre el petróleo se evaluó según la metodología de Mills y col. (1978).

El análisis semicuantitativo se aplicó a las cepas bacterianas con actividad emulsificante. Las cepas bacterianas se reactivaron en Caldo Nutricio y se les incubó a 30 °C por doce horas. Se utilizó el Medio Mineral propuesto por Mills y col. (1978).(Ver anexos página 40),al cual se le añadió petróleo crudo como única fuente de carbono.

Se repartieron 9 mL del medio en tubos de 16 x 150 mm. y se le añadió 1 mL de cultivo, incubando por treinta días a temperatura ambiente. El crecimiento se midió por la turbidez visible en el medio de cultivo. Se consideró como blanco negativo un tubo conteniendo los componentes del medio descrito sin inoculación. Las lecturas se hicieron tomando en cuenta que una turbidez de (2+) , equivalente a una población superior a 6×10^8 m.o/mL ,en la escala Turbidimétrica de Mc. Farland, corresponde a un crecimiento regular, una turbidez de tres (3+) con una población superior a 9×10^8 m.o/mL, equivale a un crecimiento bueno, y una turbidez de cinco (5+) con una población superior a 15×10^8 m.o/mL, igual a un crecimiento muy bueno.

3.2.2.4 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Para la identificación taxonómica, primero se efectuó la coloración de Gram de todas las cepas bacterianas seleccionadas, y según esto se les agrupó en bastones y cocobacilos gramnegativos, bastones y cocobacilos grampositivos, cocos gramnegativos y cocos grampositivos. Para diferenciar entre bastones grampositivos y cocos grampositivos, se realizó la prueba de catalasa, mientras que la prueba de oxidasa fue aplicada a todas las cepas bacterianas grampositivas y gramnegativas. (Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey's, 1997). Los bastones y cocobacilos gramnegativos oxidasa negativos, fueron identificados mediante pruebas bioquímicas según Bergey, 1997 y para la identificación taxonómica de los bastones y cocobacilos gramnegativos, positivos a la prueba de oxidasa, se utilizó el Sistema API 20 NE¹ (9), el cual es un sistema estandarizado que combina ocho pruebas bioquímicas y doce pruebas de asimilación, además de la prueba de oxidasa. Este sistema se aplica a cepas bacterianas que no pertenecen a la Familia de las Enterobacterias. La galería API 20 NE está compuesta de veinte microtubos que contienen medios y/o substratos en forma deshidratada. Ver flujograma N° 01. Pág 17.

PREPARACIÓN DE LA GALERÍA API 20 NE.

Sedeposité aproximadamente 5 mL, de agua destilada en los alvéolos de la cámara, para proporcionar una atmósfera húmeda a la cámara de incubación.

Se rotuló la cámara con la clave de la cepa respectiva. Luego, la galería de la bolsa hermética estéril fue incubada.

Preparación del inóculo.

En un tubo conteniendo 2 mL de cloruro de sodio al 0.85%, se realizó una suspensión bacteriana, la turbidez debía ser igual al patrón 0.5 de la Escala Mc. Farland.

Las colonias fueron obtenidas del cultivo puro en agar nutritivo.

Inoculación de la Galería

Se llenaron los microtubos, (no las cúpulas) de las pruebas Nitrato de Potasio o NO₃ a P-nitro-fenil-BD galactopiranosido oPNPG, con la suspensión bacteriana utilizando una pipeta Pasteur, evitando que se formen burbujas. Luego se transfirió cuatro a ocho gotas de la suspensión bacteriana a una ampolla de medio Auxiliar (AUX Medium). Se homogenizó con la pipeta evitando la formación de burbujas. Después se llenaron los microtubos y las cúpulas de las pruebas Glucosa (GLU) a Fenil-acetato (PAC), de tal manera que el nivel del líquido quedaba horizontal o ligeramente convexo en la cúpula, nunca cóncavo.

Se llenó luego con aceite de parafina estéril las cúpulas de las tres pruebas subrayadas (GLU; Arginina (ADH); Urea (URE), de tal manera que se formó un menisco convexo. Luego se cubrió la cámara y se incubó a 30 °C durante veinticuatro horas.

Lectura de la Galería

¹ Analytab Products, Division of Sherwood Medical 200 Express Street Plainview, New York 11803

Después de veinticuatro horas de incubación, la lectura se llevó a cabo utilizando la tabla de lectura del API 20 NE. Se anotaron todas las reacciones espontáneas: GLU, ADH, URE, Esculina (ESC), Gelatina (GEL), PNPG y se registraron en las fichas respectivas según el catálogo analítico. Las pruebas de NO_3 y Triptófano (TRP) se realizaron protegiéndolas de la contaminación.

Prueba de reducción de Nitratos a Nitritos

Se añadió una gota del reactivo Nitrato uno NIT1 y Nitrato dos NIT2 en la cúpula de NO_3 . El viraje al color rojo, después de cinco minutos, indicó una reacción positiva.

Prueba de producción de indol.(TRP).

Se añadió una gota del reactivo para Indol. La presencia de un color rosa en la cúpula indicaba una reacción positiva.

Prueba de asimilación.

Se observó el crecimiento bacteriano, el cual se evidencia por la turbidez de la cúpula. En algunos casos, fue necesario una reincubación por veinticuatro horas más, excepto las pruebas de NO_3 , TRP, y GLU que debían ser leídas únicamente a las veinticuatro horas. Ver Flujograma N° 01.

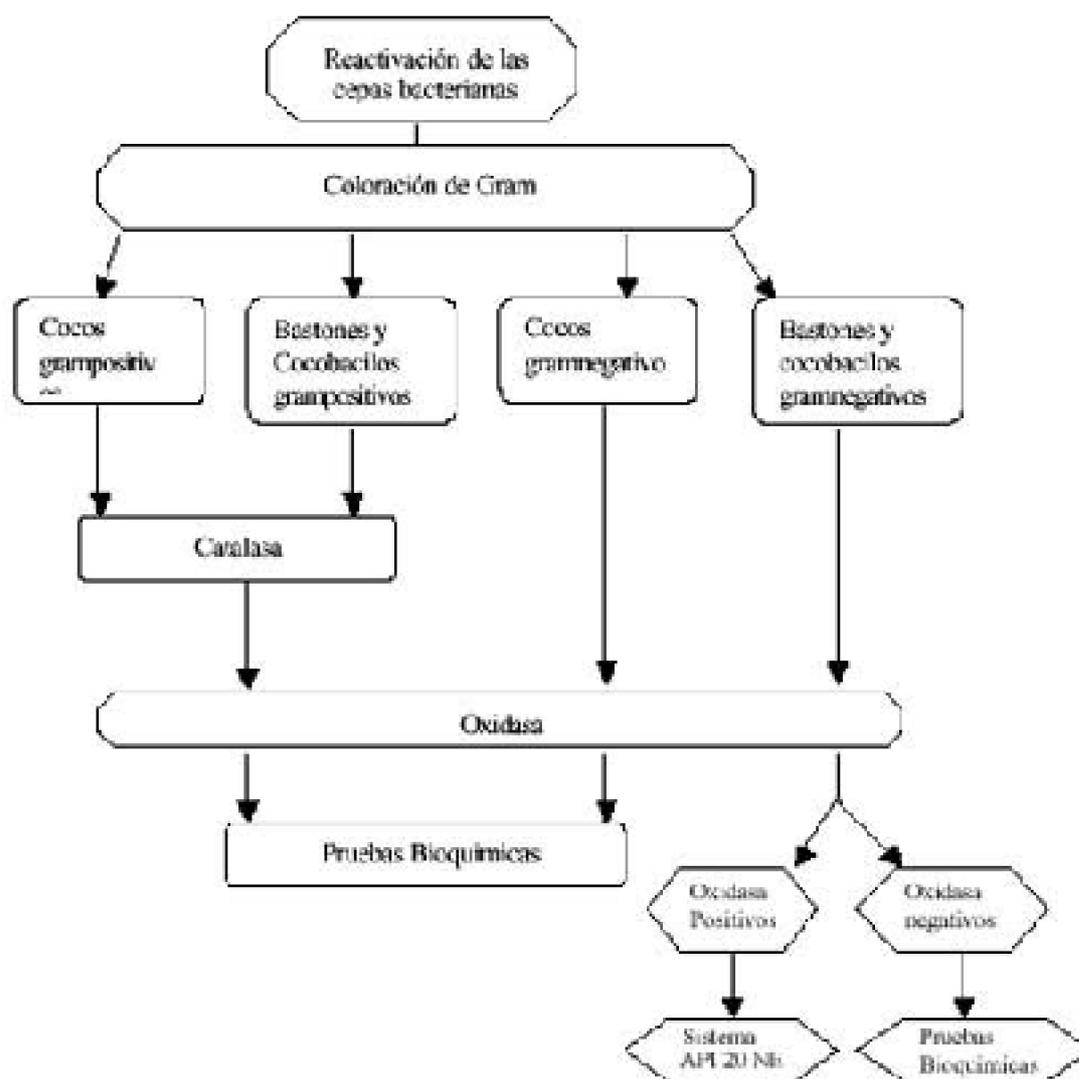


Figura 1. identificación de bacterias oleofílicas.

3.2.2.5 SELECCIÓN DEL CONSORCIO BACTERIANO EXÓGENO

Se seleccionaron como miembros del consorcio bacteriano exógeno a las cepas bacterianas que presentaron mayor actividad emulsificante y degradativa.

3.2.2.6 PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

Las cepas integrantes del consorcio bacteriano exógeno fueron reactivadas y a las veinticuatro horas fueron inoculadas cada una por separado en 3.5 mL de caldo nutritivo, al cabo de veinticuatro horas, nuevamente fueron inoculadas en 35 mL de medio mineral el cual contenía, como única fuente de carbono, extracto etéreo de crudo de petróleo, n-hexadecano o crudo de petróleo al 5 % . Finalmente, después de un día fueron inoculadas en 350 mL de medio mineral con las fuentes de carbono mencionadas.

Este procedimiento se realizó por triplicado para cada cepa hasta alcanzar un

volumen aproximado de tres litros, cantidad adecuada por ser el 10% del volumen del terrario.

El recuento de la población bacteriana de cada cepa se realizó, utilizando cámara Neubauer.

3.2.2.7 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CRUDO DE PETRÓLEO.

Se determinó la composición química porcentual del destilado de crudo de petróleo procedente de la refinería "La Pampilla" a 200 °C mediante cromatografía de gases, determinando las diferentes clases de hidrocarburos: saturados acíclicos, saturados cíclicos, insaturados olefínicos. El análisis fue realizado en la Unidad de Servicios de Análisis Químicos (USAQ) de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.(Ver anexos Pág 42)

3.2.2.8 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO DE CULTIVO.

Se determinaron las principales características fisicoquímicas del suelo de cultivo, entre ellas: textura, salinidad, materia orgánica, Carbono, Nitrógeno, Fósforo, Potasio y pH, mediante diversos análisis efectuados en el Laboratorio de Agua y Suelo de la Facultad de Ingeniería Agrícola de la Universidad Nacional Agraria La Molina. (Ver Pág 45).

3.2.2.9 ESTERILIZACIÓN DEL SUELO CON LUZ ULTRAVIOLETA.

Los treinta kilogramos de suelo fueron separados en porciones de aproximadamente 5 kg y se extendieron sobre bandejas de 60 cm de largo por 38 cm de ancho, recubiertas con bolsas de polietileno de boca ancha, el suelo no debía tener una profundidad mayor a cinco centímetros, la esterilización con luz ultravioleta (intensidad de 253-260 nm) se realizó a una distancia de 20 cm. Durante treinta minutos, removiendo el suelo cada quince minutos. La esterilidad del suelo se comprobó mediante una prueba de esterilidad, en la cual 5 g de suelo fueron suspendidos en solución salina estéril al 0.85% y a partir de la suspensión se sembró en 25 mL de caldo nutritivo y a su vez en agar nutritivo, al cabo de veinticuatro horas de incubación, no hubo crecimiento microbiano, por tanto, después de la esterilización con luz ultravioleta, el suelo fue inoculado inmediatamente para evitar cualquier contaminación.

3.2.2.10 BIODEGRADACIÓN DE CRUDO DE PETRÓLEO EN TERRARIOS.

Se evaluó con la tecnología *Landfarming*, utilizada por Beloso y col.,1998. Se acondicionaron tres terrarios o recipientes metálicos de aproximadamente 50 kg de capacidad, los cuales fueron cubiertos interiormente con una capa gruesa de pintura epóxica no biodegradable para evitar el contacto del suelo de cultivo con el metal. Posteriormente, las tres muestras de suelo de cultivo de 30 kg fueron introducidas en cada terrario y se adicionó intencionalmente crudo de petróleo a estas muestras hasta una profundidad aproximada de 5 cm., el crudo de petróleo se mantuvo en la superficie del suelo. Cuadro N° 01. Se determinó al comienzo del ensayo y cada treinta días en

cada suelo contenido en los terrarios los siguientes parámetros: temperatura, pH, humedad, contenido de hidrocarburos, recuento de microorganismos aerobios totales y microorganismos degradadores de hidrocarburos hasta los noventa días.

Los terrarios fueron:

TERRARIO N° 01.- Denominado control abiótico, este primer terrario fue tratado con un litro de hipoclorito de sodio al 5.25 %, para inhibir el crecimiento microbiano y poder evaluar únicamente la influencia de los factores ambientales en la degradación de hidrocarburos.

TERRARIO N° 02.- En este terrario el suelo se mantuvo en condiciones normales, y se observó únicamente la influencia de los microorganismos nativos del suelo en la biodegradación.

TERRARIO N° 03.- En el tercer terrario se introdujo suelo previamente esterilizado con luz ultravioleta, ver esterilización del suelo con luz U.V. (3.2.2.9 Pág 19). Posteriormente se inoculó en el suelo el consorcio bacteriano exógeno seleccionado.

Los tres terrarios se mantuvieron a la intemperie durante noventa días aireándose semanalmente mediante mezclado de todo el contenido. Cuadro N° 01. (Ver foto N° 01, anexos Pág. 47).

Tabla1. remediación por tecnología *landfarming**

TERRARIO	SUELO kg	CONCENTRACIÓN DE CRUDO DE PETROLEO 5 % kg/kg	HIPOCLORITO AL 5.25%	*CONSORCIO BACTERIANO	AGUA DESTILADA Litros
1.Control abiótico	30	5	1 litro	--	5
2.Consorcio bacteriano nativo	30	5	--	--	5
3. Consorcio bacteriano exógeno.	30	5	--	Exógeno (3 litros de cultivo)	2

3.2.2.11 CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES

Los hidrocarburos de cada muestra se extrajeron mediante soxhlet por el método 3540 EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) que consiste en mezclar 25 g de muestra con 25 g de sulfato de sodio anhidro y proceder a la extracción de hidrocarburos por soxhlet utilizando como solvente éter etílico a una temperatura constante de 60 °C durante doce horas, luego de ese tiempo reducir el volumen del solvente en un rota vapor hasta obtener un volumen menor a 10 mL. Secar el extracto adicionando 0.1 g de sulfato de sodio anhidro y transferir mediante enjuagues a un vial previamente pesado. Después de la evaporación del solvente a 25 °C, cuantificar

gravimétricamente el hidrocarburo extractable.

3.2.2.12 RECuento DE BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILAS Y OLEOFILÍCAS POR DISEMINACIÓN.

De cada muestra de suelo se pesó 10 gramos que se suspendieron en 90 mL de solución salina estéril al 0.85%, esta fue la dilución 1:10 o 10^{-1} , de la dilución 1:10 se obtuvo 1 mL y se llevó a un tubo con 9 mL de dilución, y así sucesivamente hasta la dilución 10^{-6} . Las diluciones podían continuar dependiendo del experimento. Para hacer el recuento de bacterias aerobias mesófilas, de cada tubo de dilución se transfirió 0.1 mL a cada placa petri que contenía agar Plate Count, este procedimiento se hizo por duplicado y para el recuento de las bacterias oleofílicas también se obtuvo 0.1 mL de cada dilución y se inoculó a cada placa petri que contenía agar Cetrimide más petróleo al 1 % por duplicado.

El inóculo fue depositado en un margen del agar y con la varilla horizontal de la espátula Drigalsky, se distribuyó por toda la superficie del agar evitando pasar dos veces por el mismo plano. La tapa de la placa se levantó sólo lo necesario para evitar contaminación. Las placas fueron incubadas en posición invertida de veinticuatro a cuarenta y ocho horas.

Al cabo de ese tiempo se escogieron las placas que contenían de treinta a trescientas colonias para el recuento. Para expresar el resultado final, el número total de microorganismos se multiplicó por la inversa del volumen de inóculo y por la inversa de la dilución y se reportó como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL)

3.2.2.13 MEDICIÓN DEL pH DEL SUELO

Para determinar el pH se obtuvo una muestra de 1 kg de suelo, el pH se determinó en suspensiones del suelo al 40% peso sobre volumen (P/V) en una solución de bicloruro de Calcio al 0.01 molar (CaCl_2 0.01 M), utilizando potenciómetro.

3.2.2.14 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD DEL SUELO

Antes de determinar la humedad se obtuvo una muestra de 1 kg de suelo, la humedad se determinó gravimétricamente por secado de 25 g de suelo a 105 °C hasta obtener peso constante.

3.2.2.15 MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA

La temperatura se determinó utilizando un termómetro digital en el suelo contenido en cada terrario.

3.2.2.16 ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR REGRESIÓN MÚLTIPLE

En el presente estudio, la biodegradación de crudo en terrarios cuantificada en concentración de hidrocarburos (variable Y), puede depender del tiempo, temperatura, pH, humedad, bacterias oleofílicas, tipo de suelo 1: suelo del control abiótico, tipo de suelo 2: suelo del consorcio bacteriano nativo, tipo de suelo 3: suelo del consorcio

bacteriano exógeno y bacterias aerobias mesófilas. ($X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, X_8, X_9$). Por tanto la ecuación de regresión múltiple es:

$$Y = B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_4 X_4 + B_5 X_5 + B_6 X_6 + B_7 X_7 + B_8 X_8 + B_9 X_9.$$

Donde:

Y =	Concentración de hidrocarburos (HIDROCARBUROS)
$X_1 =$	Tiempo
$X_2 =$	Temperatura
$X_3 =$	pH
$X_4 =$	Humedad
$X_5 =$	Microorganismos oleofílicos (MICROORGANISMOS)
$X_6 =$	Suelo 1
$X_7 =$	Suelo 2
$X_8 =$	Suelo 3
$X_9 =$	Bacterias aerobias mesófilas.
$B_1, B_2, B_3, B_4, B_5, B_6, B_7, B_8, B_9.$	Coefficientes de regresión neta

Para obtener el modelo final, se utilizó el programa SPSS 9.0 Windows con análisis de Regresión Múltiple por Pasos o Stepwise, (ver anexos Pág 48) con selección de variables, el cual permitió seleccionar las variables independientes de influencia significativa en el proceso de degradación, mediante la regresión por pasos, se puede manejar un gran número de variables en ejecución y calcular una secuencia de ecuaciones de regresión, incorporando o eliminando en cada paso una variable independiente, el programa de cómputo SPSS registra las variables en pasos individuales de la mejor a la peor, siempre que cumplan con el criterio estadístico establecido.

En el programa, se registra primero la variable independiente que explica la mayor cantidad de varianza en la variable dependiente. La siguiente variable por registrar, explica la mayor cantidad de varianza en conjunción con la primera y así sucesivamente. En cada paso, se registra en la ecuación la variable que explica la mayor cantidad de varianza no explicada por la variable que ya está incluida en el modelo. En la validación del modelo, la hipótesis nula se rechaza cuando el coeficiente de regresión es diferente de cero en forma significativa, el valor F es elevado y el nivel de significación es menor que 0.10, 0.05 y 0.01. La hipótesis nula indica que los coeficientes que acompañan a las variables seleccionadas son iguales a cero en forma simultánea.

Si se rechaza la hipótesis nula, se afirmaría que las variables elegidas son importantes en el proceso de biodegradación. Entonces se tiene:

$$H_0: B_1 = B_2 = 0$$

$$H_a: B_1 \neq B_2 \neq 0$$

Donde:

$$H_0: \text{hipótesis nula.}$$

H_a : hipótesis alterna.

B_1 : coeficiente de la primera variable seleccionada.

B_2 : coeficiente de la segunda variable seleccionada.

4. RESULTADOS

4.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS.

Se aislaron ciento veintinueve cepas bacterianas a partir de seis muestras de suelo contaminado con crudo de petróleo procedentes de Trompeteros, Iquitos. El 81.39% (105) de las cepas bacterianas aisladas fueron gramnegativas, de las cuales 25.71% (27) fueron bastones gramnegativos (BG-), 60% (63) fueron cocobacilos gramnegativos (CBG-) y 14.28% (15) fueron bastones cortos gramnegativos (BCG-). Entre las 24 bacterias grampositivas 18.60% del total, se encontró que 37.5% (9) fueron bastones grampositivos (BG+) y 62.5% (15) fueron cocos grampositivos (CG+)

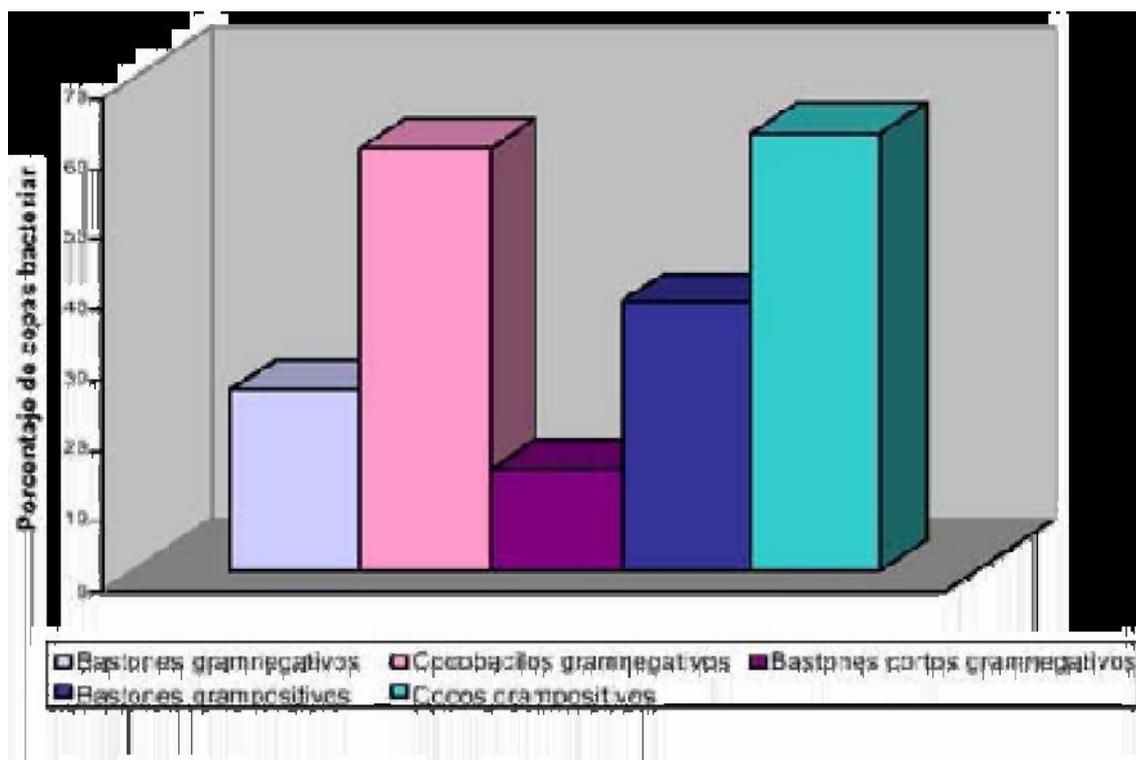


Figura 01.

4.2 ACTIVIDAD EMULSIFICANTE DE LAS BACTERIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO.

Según la prueba de actividad emulsificante, del total de cepas bacterianas, el 99.22% (128) de las cepas aisladas, presentaron actividad emulsificante y 0.77% (1) no la presentó. La actividad emulsificante fluctuó entre 0.75 UAE/mL y 3.66 UAE/mL

En el cuadro N° 02, se observan las cepas bacterianas de mayor A.E , las cuales fueron tres: *Pseudomonas aeruginosa* 4k-1, *Serratia rubidae* 6B9, *Bacillus sp.* 6Bh-1.

Tabla. 2. Actividad emulsificante de las cepas bacterianas oleofílicas identificadas

Nº	ESPECIE	ACTIVIDAD EMULSIFICANTE UAE/mL
1	<i>Acinetobacter calcoaceticus lwoffii</i> 1Bh-2	1.07
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1B-3	1.12
3	<i>Acinetobacter calcoaceticus anitratus</i> 1B-5	1.10
4	<i>Aeromonas salmonicida salmonicida</i> 2B-1	1.18
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . 4Bh2	1.13
6	<i>Acinetobacter calcoaceticus anitratus</i> 4Bh3	1.01
7	<i>Hafnia alvei</i> 4Bh4	1.03
8	<i>Hafnia alvei</i> 4Bh7	1.59
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4Bh12	1.15
10	<i>Hafnia alvei</i> 4Bh14	0.92
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4K-1	3.66
12	<i>Enterobacter agglomerans</i> 4K-3	1.072
13	<i>Enterobacter agglomerans</i> 4K-4	0.75
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 5Bh-1	0.78
15	<i>Pseudomonas acidovorans</i> 5Bh-6	1.16
16	<i>Enterobacter agglomerans</i> 5K2	1.11
17	<i>Bacillus Sp.</i> 6Bh-1	1.676
18	<i>Acinetobacter calcoaceticus lwoffii</i> 6Bh-2	1.40
19	<i>Enterobacter agglomerans</i> 6Bh-3	1.11
20	<i>Hafnia alvei</i> 6Bh-4	1.00
21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6Bh-6	1.05
22	<i>Pseudomonas cepacia</i> 6K1	1.10
23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K3	1.46
24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K5	1.04
25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K7	1.41
26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K8	1.28
27	<i>Pseudomonas cepacia</i> 6K9	1.02
28	<i>Pseudomonas pseudomallei</i> 6B4	1.5
29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6B6	1.01
30	<i>Serratia rubidae</i> 6B9	2.72

4.3 ACTIVIDAD DEGRADATIVA DE LAS CEPAS BACTERIANAS.

Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios

El 97.67 % (126) de las cepas bacterianas evaluadas, presentaron A.D, mientras que 2.32% (3) no la presentaron. La actividad degradativa de las treinta cepas bacterianas identificadas fue de regular (2+) a buena (3+). Cuadro N° 03.

Tabla 3. Actividad degradativa de las cepas bacterianas oleofílicas identificadas

N°	ESPECIE	ACTIVIDAD DEGRADATIVA
1	<i>Acinetobacter calcoaceticus lwoffii</i> 1Bh-2	2+
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1B-3	2+
3	<i>Acinetobacter calcoaceticus anitratus</i> 1 B-5	2+
4	<i>Aeromonas salmonicida salmonicida</i> 2B-1	2+
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4Bh2	2+
6	<i>Acinetobacter calcoaceticus anitratus</i> 4Bh3	2+
7	<i>Hafnia alvei</i> 4Bh4	2+
8	<i>Hafnia alvei</i> 4Bh7	2+
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4Bh12	2+
10	<i>Hafnia alvei</i> 4Bh14	3+
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4K-1	3+
12	<i>Enterobacter agglomerans</i> 4K-3	2+
13	<i>Enterobacter agglomerans</i> 4K-4	3+
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 5Bh-1	3+
15	<i>Pseudomonas acidovorans</i> 5Bh-6	2+
16	<i>Enterobacter agglomerans</i> 5K2	3+
17	<i>Bacillus Sp.</i> 6Bh-1	3+
18	<i>Acinetobacter calcoaceticus lwoffii</i> 6Bh-2	2+
19	<i>Enterobacter agglomerans</i> 6Bh-3	2+
20	<i>Hafnia alvei</i> 6Bh-4	3+
21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6Bh-6	2+
22	<i>Pseudomonas cepacia</i> 6K1	3+
23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K3	2+
24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K5	2+
25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K7	2+
26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K8	2+
27	<i>Pseudomonas cepacia</i> 6K9	2+
28	<i>Pseudomonas pseudomallei</i> 6B4	3+
29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6B6	3+
30	<i>Serratia rubidaea</i> 6B9	3+

4.4 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Las treinta cepas bacterianas de mayor actividad emulsificante fueron identificadas taxonómicamente. Del total de cepas bacterianas identificadas 13.3% (4) pertenecían al género *Acinetobacter*, 50% (15) al género *Pseudomonas*, 13.3% (4) al género *Hafnia*, 3.3% (1) fue *Aeromonas*, 3.3% (1) fue *Bacillus*, 3.3% (1) fue *Serratia* y 13.3% (4) al género *Enterobacter*. Cuadros N° 02 y 03. Las especies del género *Pseudomonas*, fueron: *Pseudomonas aeruginosa* (36.67%), *Pseudomonas acidovorans* (3.33%), *Pseudomonas cepacia* (6.67%), *Pseudomonas pseudomallei* (3.33%).

4.5 SELECCIÓN DEL CONSORCIO BACTERIANO EXÓGENO.

Las cepas bacterianas seleccionadas para formar el consorcio bacteriano exógeno fueron: *Pseudomonas aeruginosa* 4k-1, *Bacillus sp.* 6Bh-1 y *Serratia rubidaea* 6B9, las que presentaron una A.E de 3.66 UAE/mL, 1.676 UAE/mL y 2.72 UAE/mL respectivamente y una actividad de tres (3+) equivalente a una A.D. buena. La población del consorcio bacteriano exógeno se observa en el cuadro N° 04.

Tabla 4. Población del consorcio bacteriano exógeno

ESPECIE	POBLACIÓN (Bact/mL)
<i>Serratia rubidaea</i> 6B9	1.92×10^7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4k-1	2.69×10^7
<i>Bacillus Sp.</i> 6Bh-1	4.93×10^7

4.6 BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

En el cuadro N° 05, se observa la temperatura, humedad y pH del suelo en los diferentes terrarios: control abiótico (C.A), consorcio bacteriano nativo (C.N) y consorcio bacteriano exógeno (C.E).

La temperatura no tuvo mucha variación y fue similar en los tres terrarios, la mayor temperatura se presentó en el suelo del C.N, la cual alcanzó 19.3 °C a los sesenta días, temperatura similar a la del C.E (19 °C) y a la del C.A (18.4°C).

En cambio la humedad tuvo variaciones durante los noventa días, la humedad más

Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios

alta se observó a los treinta días en el terrario C.E, la cual fue 84 mL/kg, que fue mayor a la del C.N (64mL/kg) y similar a la del C.A (80mL/kg).

El pH, generalmente se mantuvo cercano a la neutralidad, sin embargo, presentó una ligera disminución al cabo de tres meses de 7.5 a 6.0 en los terrarios: C.N y C.E, pero en el C.A permaneció en siete.

Tabla 5. Temperatura, humedad y ph del suelo contenido en los terrarios.

DÍAS	TEMPERATURA °C			HUMEDAD mL/kg			pH		
	C.A ¹	C.N ²	C.E ³	C.A	C.N	C.E	C.A	C.N	C.E
0	16.8	17.7	17.6	0.005	0.0053	0.0045	7.45	7.5	7.55
30	17.1	18.2	19.2	80.0	64.0	84.0	8.0	7.54	7.64
60	18.4	19.3	19.0	28.0	28.0	48.0	7.58	7.88	7.9
90	15.7	16.3	16.1	52.0	16.0	8.0	7.0	6.0	6.0

1. C.A: Control abiótico. 2. C.N: Consorcio bacteriano nativo 3. C.E: Consorcio bacteriano exógeno.

El mayor porcentaje de biodegradación fue 92.5% a los noventa días y se obtuvo en el terrario que contenía el consorcio bacteriano exógeno, en el cual hubo una reducción de la concentración de hidrocarburos de 1.2 g de hidrocarburos /25 g de suelo a 0.09 g /25 g a los noventa días. Cuadro

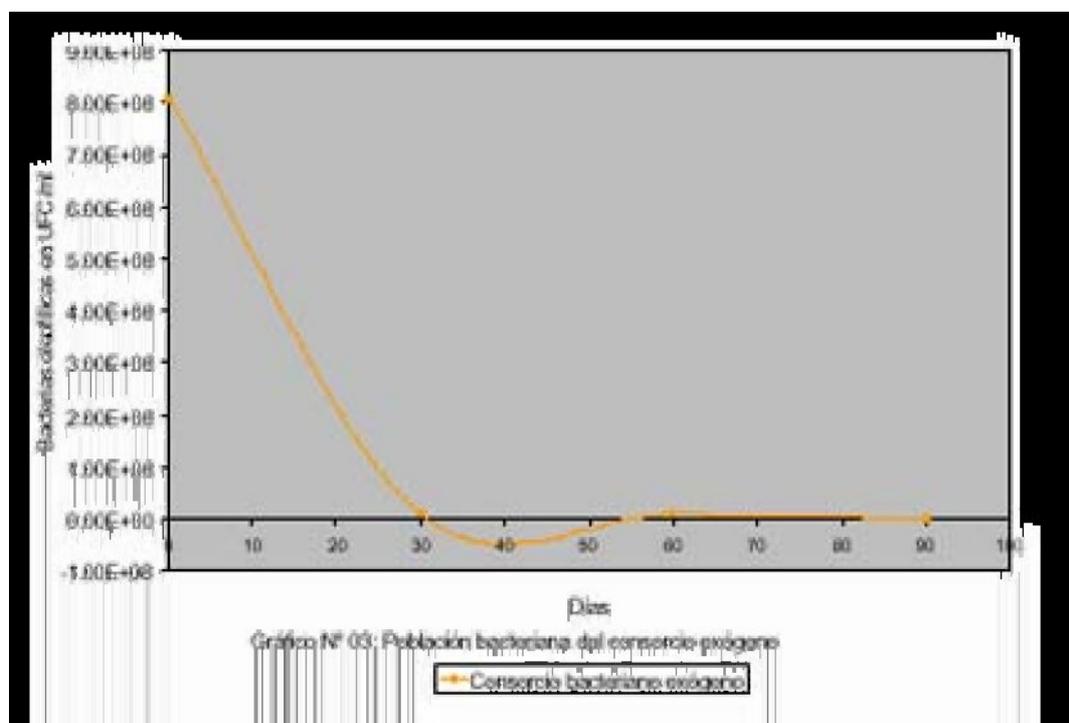
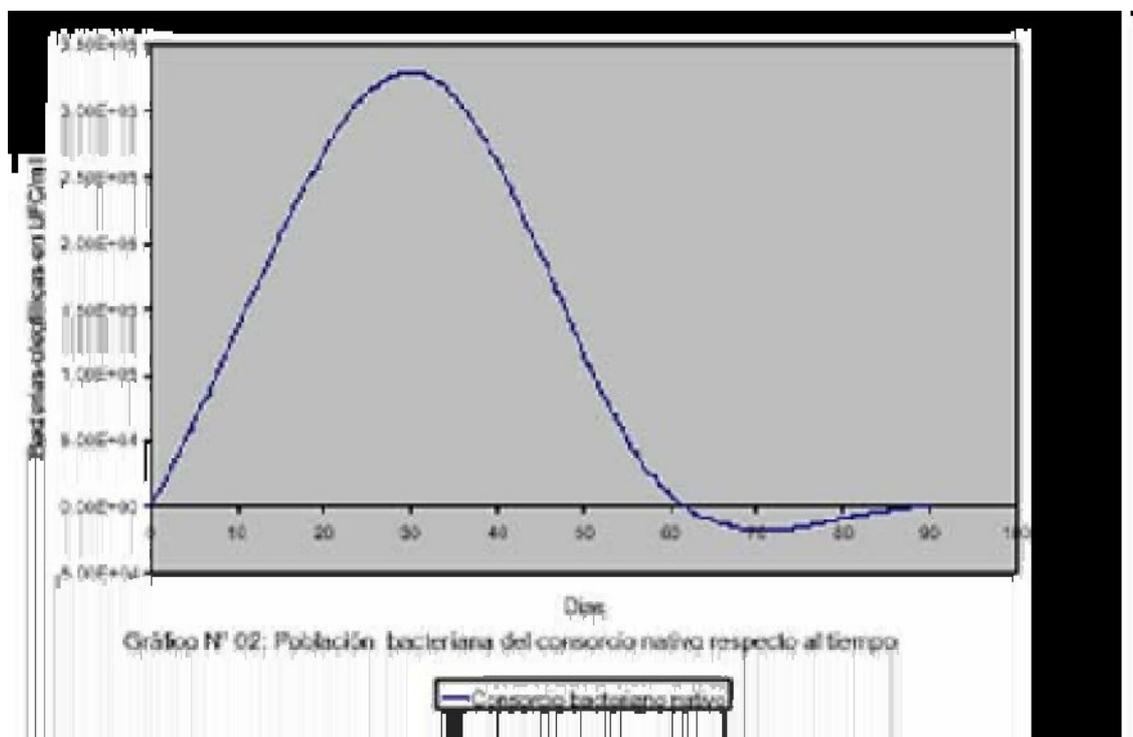
Nº 06. Los parámetros de este terrario fueron: temperatura de 16.1 °C, pH igual a 6.0, humedad de 8 mL/kg, (Cuadro Nº 05), un promedio de 1.85×10^8 UFC/mL de microorganismos aerobios mesófilos y un promedio de bacterias oleofílicas de 2.12×10^4 UFC/mL

Tabla 6. Porcentaje de reducción de hidrocarburos en terrarios.

TIEMPO	CONTROL ABIÓTICO		CONSORCIO BACTERIANO NATIVO		CONSORCIO BACTERIANO EXÓGENO	
	Hidrocarburos g/25 g	% parcial de reducción de hidrocarburos	Hidrocarburos G/25 g	% parcial de reducción de hidrocarburos	Hidrocarburos g/25 g	% parcial de reducción de hidrocarburos
0	0.4	0	0.15	0	1.2	0
30	0.18	55	0.27	-80	0.44	63.4
60	0.18	0	0.25	13.4	0.21	19.1
90	0.18	0	0.06	126.6	0.09	10.0
TOTAL		55		60		92.5

Según el primer recuento de bacterias oleofílicas, no se observó crecimiento bacteriano en el suelo del terrario del consorcio nativo, sin embargo al cabo de treinta días, la población bacteriana aumentó a 3.30×10^5 UFC/mL Ver gráfico Nº 02, en cambio la población de bacterias oleofílicas del consorcio exógeno fue mayor en el tiempo inicial (8.08×10^8 UFC/mL), sin embargo al cabo de treinta días la población

bacteriana disminuyó a 9.63×10^6 UFC/mL Ver gráfico N° 03. A partir de los treinta días, tanto en el consorcio nativo como en el exógeno, la cantidad de bacterias oleófilas, disminuyó progresivamente, en forma directamente proporcional a la disminución en la concentración de hidrocarburos. Ver gráficos N° 02 y 03. En el control abiótico en el tiempo inicial, el crecimiento bacteriano fue bajo (2.5×10^3 UFC/mL), sin embargo a los noventa días no se observó crecimiento.



4.6.1 REGRESIÓN MÚLTIPLE POR PASOS

De acuerdo a la regresión múltiple por pasos o Stepwise se encontró un modelo para el análisis de datos, el cual, selecciona a la variable microorganismos como variable independiente de influencia significativa en el proceso de biodegradación de hidrocarburos y excluye a las otras variables independientes. Cuadro N° 07.

Tabla 7. Variables introducidas y eliminadas por el método de regresión múltiple por pasos o stepwise ^a

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	MICROORGANISMOS	Días, humedad, pH, suelo 1, suelo 2, suelo 3 y temperatura.	Por pasos (criterio: Probabilidad de F para entrar <= 0.050, probabilidad de F para salir >= 0.100)

Variable dependiente: HIDROCARBUROS

El modelo fue elegido por el programa SPSS, por no tener intercepto y tener un coeficiente de determinación o R cuadrado del 78% aproximadamente, es decir que el modelo se ajusta bien a los datos por que el R cuadrado es alto. Cuadro N° 08.

Tabla 8. Resumen del modelo

Modelo	R	R Cuadrado a	R Cuadrado corregida	Error típico de la estimación	Cambiar los estadísticos				
					Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1	gl2	Sig del cambio en F
1	0.883	0.780	0.760	8071.7585	0.780	39.016	1	11	0.000

Para la regresión a través del origen (el modelo sin intersección), R cuadrado mide la proporción de la variabilidad en la variable dependiente acerca del origen explicado por la regresión. No es posible comparar esto con R cuadrado para los modelos que incluyen una intersección.

Variable predictora: MICROORGANISMOS.

Según el cuadro N° 09, el modelo es válido porque se rechaza la hipótesis nula debido a que el coeficiente de regresión es diferente de cero en forma significativa y el valor de F es elevado

(F = 39.016), además la significancia es menor que 0.01, por tanto se afirma que la variable microorganismos es importante en el proceso de biodegradación de crudo en suelos.

Tabla 9.-Anova

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
1 Regresión	2.54E+09	1	2.54E+09	39.016	0.000 ^a
Residual	7.17E+08	11	65153286		
Total	3.26E+09 ^b	12			

Variable predictora: MICROORGANISMOS

Esta suma total de cuadrados no se ha corregido para la constante porque la constante es cero para la regresión a través del origen.

En el cuadro N° 10, la variable microorganismos participa en la explicación de la variable dependiente concentración de hidrocarburos (HIDROCARBUROS) con un coeficiente estándar del 0.883 y una confiabilidad próxima al 100%. Según el estadístico t se rechaza la hipótesis nula, es decir existe una alta relación entre la variable HIDROCARBUROS y la variable independiente MICROORGANISMOS.

Tabla 10. Coeficientes de regresión

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	T	Sig
	B	Error típico	Beta		
1 MICROORGANISMOS	6.158E-04	0.000	0.883	6.246	0.000

En el cuadro N° 11 se observan las variables que han sido excluidas por no tener significancia estadística en el modelo.

Tabla N° 11. Variables excluidas

Modelo	Beta dentro	T	Sig	Correlación parcial
1 DIAS	0.279 ^a	2.336	0.042	0.594
HUMEDAD	0.323 ^a	2.971	0.014	0.685
pH	0.441 ^a	5.726	0.000	0.875
SUELO 1	0.301 ^a	2.642	0.025	0.641
SUELO 2	0.211 ^a	1.597	0.141	0.451
SUELO 3	0.211 ^a	1.597	0.141	0.451
TEMPERATURA	0.437 ^a	5.572	0.000	0.870

Variable predictora en el modelo: MICROORGANISMOS

5. DISCUSIÓN

De manera similar a Arenas en 1999, quien aisló doscientas sesentaidos cepas bacterianas de agua y tierra procedentes de la refinería “La Pampilla”, de las cuales 68% fueron gramnegativas, en el trabajo, también se obtuvo un elevado número de cepas bacterianas oleofílicas (cientoventinueve), aisladas de suelos procedentes de Trompeteros, Iquitos, de las cuales el 81.39% fueron gramnegativas. Por tanto, se confirma que existen bacterias capaces de metabolizar hidrocarburos. Arenas, aisló mayor cantidad de bacterias consumidoras de hidrocarburos, porque las muestras que evaluó procedían de una zona con mayor concentración de hidrocarburos. Atlas, en 1983, afirmó que la población de bacterias oleofílicas aumenta después de derrames de petróleo y es directamente proporcional a la concentración de hidrocarburos.

Se encontró además, que el 99.22% de cepas bacterianas presentaron actividad emulsificante, este resultado corrobora lo afirmado por Hayes y col., en 1986, quienes indicaron que muchos microorganismos sintetizan biosurfactantes y bioemulsificantes, que permiten asimilar los hidrocarburos. La actividad emulsificante y degradativa de las cepas bacterianas aisladas, fue menor a la obtenida por Arenas, debido a las características genéticas de las cepas bacterianas, así la mayor actividad degradativa alcanzada fue tres (3+), en cambio, Arenas, obtuvo una actividad degradativa de cinco (5+)

En la identificación taxonómica se verificó la existencia de especies del género *Pseudomonas*: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas acidovorans*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas pseudomallei*, especies identificadas

también por otros investigadores, quienes afirman que los microorganismos del género *Pseudomonas sp.*, tienen un rol importante en la degradación de petróleo, así Leahy y Colwell en 1990, indicaron que los microorganismos degradadores de hidrocarburos más importantes, tanto en aguas como en suelos son: *Pseudomonas sp.*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium* y *Nocardia*, Rentería y Miranda, en 1998, encontraron cinco cultivos de mayor actividad biodegradativa: *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium* y Tantaleán y Altamirano, en 1998, encontraron un cultivo mixto de *Pseudomonas sp.* nativas que tuvieron la mayor capacidad para utilizar el petróleo diesel D2.

En cuanto a la biodegradación de crudo en terrarios, el consorcio bacteriano exógeno produjo mayor biodegradación en los suelos evaluados, debido a la numerosa población de bacterias oleofílicas y a la capacidad degradativa elevada que presentaba, con respecto al consorcio bacteriano nativo, el cual degradó en menor cantidad los hidrocarburos debido a que el suelo de cultivo en el cual se realizó el ensayo de biorremediación procedía de una zona que no había sido anteriormente contaminada con hidrocarburos, por tanto inicialmente, no presentaba bacterias oleofílicas, así según el primer recuento realizado en laboratorio, no existían bacterias oleofílicas en el suelo, sin embargo después de un mes de la adición intencional de crudo de petróleo al suelo, se encontró un aumento en la población bacteriana a 3.30×10^5 UFC/mL, esto indica que se estimuló el crecimiento de bacterias oleofílicas, al adicionar el crudo de petróleo, en cambio la población de bacterias exógenas fue disminuyendo progresivamente, a medida que los hidrocarburos eran degradados, la disminución de bacterias oleofílicas fue directamente proporcional a la disminución en la concentración de hidrocarburos, esto se atribuye a que cuanto menos sustrato tienen las bacterias hidrocarburoclásticas, estas se encuentran en menor cantidad. No se puede afirmar que el 55 % de degradación hallada en el control abiótico se deba a factores ambientales puesto que se encontró cierta cantidad de microorganismos debido a una contaminación, en cambio Belloso y col., 1998, en el control abiótico, lograron inhibir completamente la microbiota del suelo utilizando bicloruro de mercurio.

El porcentaje de biodegradación de hidrocarburos producido por el consorcio bacteriano exógeno a los treinta días fue 63.4%, porcentaje mayor al obtenido por Belloso y col. quienes lograron una degradación de 45% a los treinta días, esto debido a que inocularon una sola cepa bacteriana oleofílica, en cambio en el presente estudio se inoculó un consorcio bacteriano exógeno conformado por tres cepas bacterianas oleofílicas, también Belloso y col. encontró menor reducción de hidrocarburos en el terrario donde se encontraban las bacterias nativas (12%) y en el control abiótico (8%) Sabirova en el 2000, obtuvo aún menor porcentaje de biodegradación (22%) a los treinta días, después de aplicar un consorcio bacteriano halotolerante para la biodegradación de hidrocarburos en suelos, esto se debe a que la salinidad inhibe la actividad microbiana en suelos, mientras que en el control abiótico encontró un proceso degradativo lento de 22% de degradación al cabo de ocho meses, esto reafirma la importancia que tienen los microorganismos en la biodegradación de crudo de petróleo en suelos así en la presente investigación, se encontró que los microorganismos oleofílicos participaron directamente en la variación de la concentración de hidrocarburos en los terrarios con un coeficiente estándar de 0.883 y una confiabilidad próxima al 100 %, Díaz y col. en 1999, evaluaron la

biodegradación de hidrocarburos utilizando un consorcio microbiano de la rizósfera de *Cyperus laxus Lam.* en condiciones de laboratorio y encontraron una biodegradación del 62.28% a los treintaicuatro días, aunque el estudio no fue realizado a nivel de terrarios, el porcentaje de biodegradación fue similar al alcanzado en el presente trabajo, el cual fue 63.4 % a los treinta días.

La fertilidad del suelo de cultivo evaluado favoreció el proceso biodegradativo. Sirvins y Tramier en 1993, afirman que la tasa de eliminación del petróleo después de siete días, en la naturaleza aumenta a 62-70% e incluso 79% cuando se añade nutrientes.

A los noventa días del experimento, se alcanzó mayor porcentaje de biodegradación (92.5 %) que el encontrado a los cientoventa días (57%) por Dibble y Bartha en 1979, quienes evaluaron el efecto de los parámetros ambientales en la biodegradación del crudo de petróleo en suelos fértiles.

6. CONCLUSIONES

- Se aislaron cientoventinueve cepas bacterianas capaces de degradar hidrocarburos, de las cuales, el 99.22% presentaron actividad emulsificante y el 97.67% presentaron actividad degradativa.
- El porcentaje de biodegradación producido por el consorcio bacteriano exógeno (92.5%) fue mayor al del consorcio bacteriano nativo (60%) a los noventa días.
- Los microorganismos oleofílicos influyeron significativamente en la biodegradación de crudo de petróleo en los terrarios con una confiabilidad próxima al 100 %.
- A los noventa días, se logró biodegradar el 92.5 % de los hidrocarburos en el terrario que contenía el consorcio bacteriano exógeno conformado por *Pseudomonas aeruginosa* 4k-1, *Serratia rubidaea* 6B9 y *Bacillus sp.*6Bh-1.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARENAS, S.1999. Aislamiento y caracterización de bacterias de ambientes contaminados por petróleo en la refinería "La Pampilla". UNMSM. Lima. (Tesis para optar por el título de Biólogo.)
2. ATLAS, R.1983. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiological Reviews. March. Vol. 45 (1): 180-209. Louisville.
3. ATLAS, R. y BARTHA, R. 1977. The microbiology of aquatic oil spills. Adv. Appl. Microbiol. 22: 225-266.
4. BELLOSO, C.; CARRARIO, J.; VIDUZZI, D.1998. Biodegradación de hidrocarburos en suelos contenidos en terrarios. XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. San Lorenzo.
5. BERGEY'S, 1997. Manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Ed. Copyright.
6. BRADSHAW, J. 1976. Microbiología de laboratorio. Ed. El Manual Moderno, S.A.
7. DIAZ, I.; FAVELA, E.; GALLEGOS, M.; GUTIERREZ, M.1999. Biodegradación de hidrocarburos por un consorcio microbiano de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam. Libro de Resúmenes: VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. P. 424. México.
8. DIBBLE, J. y BARTHA, R.1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Cook College, Rutgers-The State University of New Jersey. 37 (4):729-739.

9. GEISS, H.K.; PIOTROWSKI, H.D.; HINGST, V. 1985. Evaluation os API 20 NE in routine diagnostics of nonfermenting gram-negative rod-shaped bacteria. Zbl Bakt. Mikrobiol. Hyg. A-Med 259, 1, 35-42.
10. GOLDMAN, S.; SHABTAIT, C.; RUBINONIZ, E.; ROSENBERG Y.; GUTNICK, D.L.1982. Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1: Distribution of cell-free and cell associated cross-reacting material. Applied and Environmental Microbiology 44 (1); 165-170.
11. HAYES, M.; NESTAAS, E.; HREBENAR, K.1986. Microbial surfactants. Chemtech. April. P. 239-243. USA.
12. LEAHY, J. y COLWELL, R.1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews. 3 (54): 305-315. Maryland.
13. MERINO, F.1998. Estudio de microorganismos nativos productores de emulsificantes de petróleo. UNMSM. Lima-Perú. (Tesis para optar por el grado de Magister)
14. MILLS, A.L.; BREUIL, C.; COLWELL, R.R. 1978. Enumeration of petroleum degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method Canadian Journal of Microbiology 24. 552-557.
15. RAMORINO, S. 1989. Diagnóstico sobre la contaminación por hidrocarburos de petróleo en el pacífico sudeste: Colombia, Chile, Ecuador, Panamá y Perú. CPPS, PNUMA, COI. Valparaíso.
16. RENTERÍA, A. y MIRANDA, H.1998. Aislamiento y selección primaria de microorganismos capaces de utilizar petróleo como única fuente de carbono. Libro de Resúmenes I Congreso Peruano de Biotecnología y Bioingeniería, 12-15 Noviembre. Trujillo.
17. SABIROVA, I. 2000. The potential application of halotolerant microorganisms for bioremediation of soils polluted with crude oil and hypersaline wastewaters. Kazan State University.
18. SIRVINS, A. y TRAMIER, B.1993. La biodegradación de los hidrocarburos. Mundo Científico. 54(6): 46-54.
19. TANTALEAN, J. y ALTAMIRANO, R.1998. Aislamiento y evaluación del crecimiento de *Pseudomonas spp.* hidrocarburoclásticas en petróleo Diesel 2. Libro de Resúmenes del I Congreso Peruano de Biotecnología y Bioingeniería. Noviembre. Ica.
20. WEDEL, R.; MOSQUERA, J.; GOLDSMITH, D.; HATER, G.; WONG, A.; FOX, T.; HUNT, W.; PAULES, M.; QUIROS, J.; WIEGAND, J.1988. Bacterial biodegradation of petroleum hydrocarbons in groundwater, in situ augmented bioreclamation with enrichment isolates in California. Water Science and Technology. 20 (11/12): 501-530.

8. ANEXOS

8.1 COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO

CALDO ACETATO MINERAL

Fosfato ácido de sodio dodecahidratado.	2.25 g
Fosfato diácido monopotásico	0.345 g
Sulfato de Magnesio heptahidratado	0.05 g
Cloruro de Amonio	0.25 g
Acetato de Sodio	0.000125 g
Bicloruro de Calcio dihidratado	0.00025 g
Solución de elementos traza	0.75 mL
Carbonato de Sodio al 0.05%	0.11 mL
Agua destilada	250 mL
pH final	7.0
Esterilización a 121 °C por 15 min.	

MEDIO AUXILIAR (AUX MEDIUM)

Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios

Sulfato amoníaco	2 g
Base	82.8 mg
Aminoácidos.	250 mg
Vitaminas y sustancias nutritivas	35.9 g
Tampón fosfato	0.04 M pH= 7.1 1000 mL
Agar	1.5 g
pH final	7.0-7.2
Esterilización a 121 °C por 15 min.	

CETRIMIDE AGAR

Peptona de gelatina	20 g
Cloruro de Magnesio	1.4 g
Sulfato potásico	10 g
N-cetil-N,N,N,-trimetilamonibromuro(Cetrimide)	0.3 g
Agar-agar	13 g
Glicerina	10 mL
Petróleo al 1 %	

Esterilización a 121 °C por 15 min.

AGAR KING-B

Peptona de carne	4 g
Glicerol	2 g
Fosfato diácido de Potasio	0.3 g
Sulfato de Magnesio	0.3 g
Agar	3 g
Agua destilada	200 mL
pH final	7.0

Esterilización a 121 °C por 15 min.

MEDIO MINERAL

Cloruro de Sodio	24 g
Cloruro de Potasio	0,7 g
Fosfato diácido de Potasio	2,0 g
Sulfato de Magnesio heptahidratado	1,0 g
Fosfato ácido di sódico	3,0 g
Nitrato de Amonio	1,0 g
Agua destilada	1000 mL
Petróleo crudo	10 mL
pH final	7.0

Esterilización a 121°C por 15 minutos.

MEDIO MÍNIMO DE GOLDMAN

Fosfato ácido di potásico	18 g
Fosfato diácido de Potasio	6 g
Sulfato de Magnesio	0.02 g
Sulfato diamónico	4 g
Etanol	20 mL
Agua destilada.	1000 mL
pH final	7.0
Esterilización a 121°C por 15 minutos.	
Extracto de levaduras al 3%.	

MEDIO PALLERONI

Fosfato ácido di sódico	9.37 g
Fosfato diácido de Potasio	8.976 g
Cloruro de Sodio	1.7 g
Cloruro de Amonio.	0.2 g
Sulfato de Magnesio heptahidratado	0.1 g
Citrato amónico férrico	0.01 g
Cloruro de Calcio	0.001 g
Agua destilada	200 mL
pH final	6.8

Esterilización a 121 °C por 15 min., excepto el Citrato amónico férrico y Cloruro de Calcio el cual se esteriliza por filtración y se adiciona en condiciones estériles a partir de una solución concentrada.

8.2 CARACTERÍSTICAS DEL DESTILADO DE CRUDO DE PETRÓLEO A 200 °C

Tabla 12.

Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios

Nº	Tiempo de retención (T _R)	Componentes	Peso molecular (PM)	Fórmula	%
1	1.33	n-pentano		C5H12	0.49
2	1.55	n-hexano		C6H14	0.77
3	2.07	n-heptano		C7H16	0.57
4	2.69	2 metil pentano		C6H14	0.64
5	3.17	3 metil hexano		C7H14	1.82
6	3.87	1,1,2trimetil ciclohexano		C9H28	2.18
7	4.28	1-hexeno		C6H12	2.14
8	4.43	2 metil hexano		C7H16	2.05
9	5.09	2 etil hexano		C8H18	7.58
10	7.74	2 metil decano		C11H24	9.52
1	8.28	4 metil decano		C12H26	0.38
12	10.76	n-nonano		C9H20	13.17
13	15.83	2 metil undecano		C12H26	5.95
14	16.86	3,5 dimetil octano		C10H22	9.39
15	17.79	2 metil undecano		C12H26	2.55
16	19.64	Dodecano		C12H26	8.56
17	22.34	n-tridecano		C13H28	7.86
18	24.88	n-tetradecano		C14H30	5.09
19	24.88	Tetradecano		C14H30	3.48
20	25.90	2 metil tridecano		C14H30	3.90
21	27.30	n-pentadecano		C15H32	3.93
22	29.60	Pentadecano		C15H32	1.37
23	31.80	n-hexadecano		C16H34	1.22
24	33.91	n-heptadecano		C17H36	0.96
25	35.94	n-octadecano		C18H38	0.85
26	37.87	Octadecano		C18H38	0.77
27	39.73	n-eicosano		C20H42	0.71
28	41.51	n-heneicosano		C21H44	0.55
29	43.23	n-dodocosano		C22H46	0.43
30	44.89	n-pentacosano		C25H52	0.37
31	46.47	n-octacosano		C28H58	0.20
32	48.08	n-nonacosano		C29H60	0.20
33	49.97	n-triacontano		C30H62	0.20
34	52.22	n-dotriacontano		C32H66	0.10

INTERPRETACIÓN:

Saturados aciclicos	95.77% (37.38% parafínico)
Saturados cíclico	2.18
Insaturados-olefínico	2.05
Aromáticos	<u>0.00</u>
	100.00

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS GRAVEDAD API A 60° F 19.0

DESTILACIÓN	%DESTILADO
Hasta 200 °C	15
Residuo pesado	85

CONDICIONES CROMATÓGRAFO DE GASES: GC/MS

Columna:	Medianamente polar SUPELCO 608
T. Horno:	80 °C (8,5'); 45 °C/min hasta 150 °C (1') 8 °C/min hasta 280 °C (12')
Injector:.	80 °C (0,2'); 50 °C/min hasta 100 °C (5'); 50 °C/min hasta 300 °C hasta el final de corrida.
Vol.inj:	1,5 μ l
Split:	\square 50:1 \square
Gas arrastre:	Helio 20.8psi (1,73 mL/min)

NOTAS:

TR: Tiempo de retención, secuencia en que se separan los componentes en el cromatograma.

PM: Peso molecular

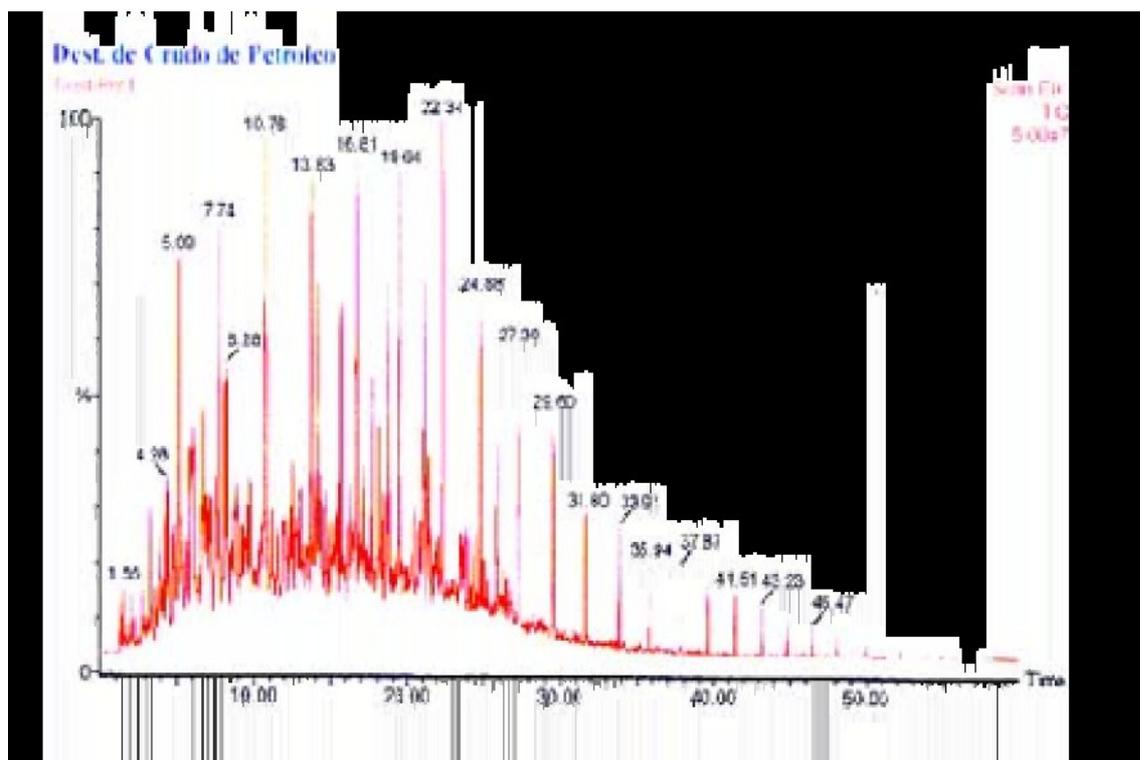


Gráfico Nº 01: Tiempo de retención en la columna y porcentaje de cada componente del destilado de crudo.

8.3 CARACTERÍSTICAS DEL SUELO DE CULTIVO.

INTERPRETACIÓN:

CONDUCTIVIDAD :	C.E. (sales). Según respuesta de los cultivos (dS/m)
Muy ligeramente salino:	< 2
Ligeramente salino:	2-4
Moderadamente salino:	4-8
Fuertemente salino:	8-16
Extremadamente salino:	>16
MATERIA ORGANICA (M.O)	
Bajo:	< 2%
Medio:	2-4%
Alto:	>4%
CALCAREO TOTAL CaCO3%	
Bajo:	< 1%
Medio:	1-5%
Alto:	> 5%
FÓSFORO P (ppm)	
Bajo:	< 7%
Medio:	7-14%
Alto:	>14 %
POTASIO K₂O (kg/ha)	
Bajo:	< 300
Medio:	300-600
Alto:	> 600
REACCION DEL SUELO (pH)	
Fuertemente ácido:	5.1-5.5
Moderadamente ácido:	5.6-6.0
Ligeramente ácido:	6.1-6.5
Neutro:	6.6-7.3
Ligeramente alcalino:	7.4-7.8
Moderadamente alcalino:	7.9-8.4
EQUIVALENCIAS	
1 mmhos/cm =	1 dS/m
1 cmol (+) kg =	1 me/100g

8.4 BIODEGRADACIÓN DE CRUDO EN TERRARIOS



FOTO N° 01.a. CONSORCIO BACTERIANO EXÓGENO CONSORCIO BACTERIANO NATIVO



FOTO N° 01.b. CONSORCIO BACTERIANO EXÓGENO CONSORCIO BACTERIANO NATIVO



Figura 8. CONTROL ABIÓTICO

8.5 DETERMINACIÓN DE LA REGRESIÓN MÚLTIPLE POR PASOS CON EL PROGRAMA SPSS 9.0 WINDOWS.

ESCALA TURBIDIMÉTRICA MC. FARLAND

Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios

Tubo	Cloruro de Bario (1%)	Ácido sulfúrico(1%)	Millones de m.o/mL
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000

2

² Fuente: Microbiología de laboratorio (Bradshaw, 1976)