

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE DIÉSEL EFECTUADA POR MICROORGANISMOS ACIDÓFILOS AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

Tesis presentada por la Bachiller:

Hermoza Gutiérrez, Marián Alicia

Para optar el Título Profesional de:

Ingeniera Biotecnóloga

Asesor: Dr. Villanueva Salas, José Antonio

AREQUIPA – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. **16013762**

N° Trámite en Fac. **280-2016**

Fecha Recep. Fac. **04-04-2016**

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **HERMOZA GUTIERREZ, Marián Alicia**

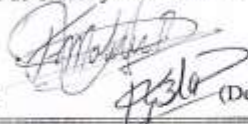
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DEGRADATIVA DE MICROORGANISMOS NATIVOS AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIESEL 2"

DICTAMINADORES: 1) Mgter. Roxana Bardales Álvarez 2) Mgter. Fredy Molina Rodríguez

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMAS:  (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA

ASESOR: **Dr. José Villanueva Salas**

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS EFECTUADA POR MICROORGANISMOS ACIDOFILOS AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIESEL"**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

Atentamente


FIRMA  FECHA **04/08/18**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Mgter. Roxana Bardales Álvarez** 3) **Ing. Cinthia Córdova Barrios**
2) **Dr. Fredy Molina Rodríguez**


DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: **"DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACION DE DIESEL EFECTUADA POR MICROORGANISMOS ACIDOFILOS AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS"** y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA  (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA **27-09-18**

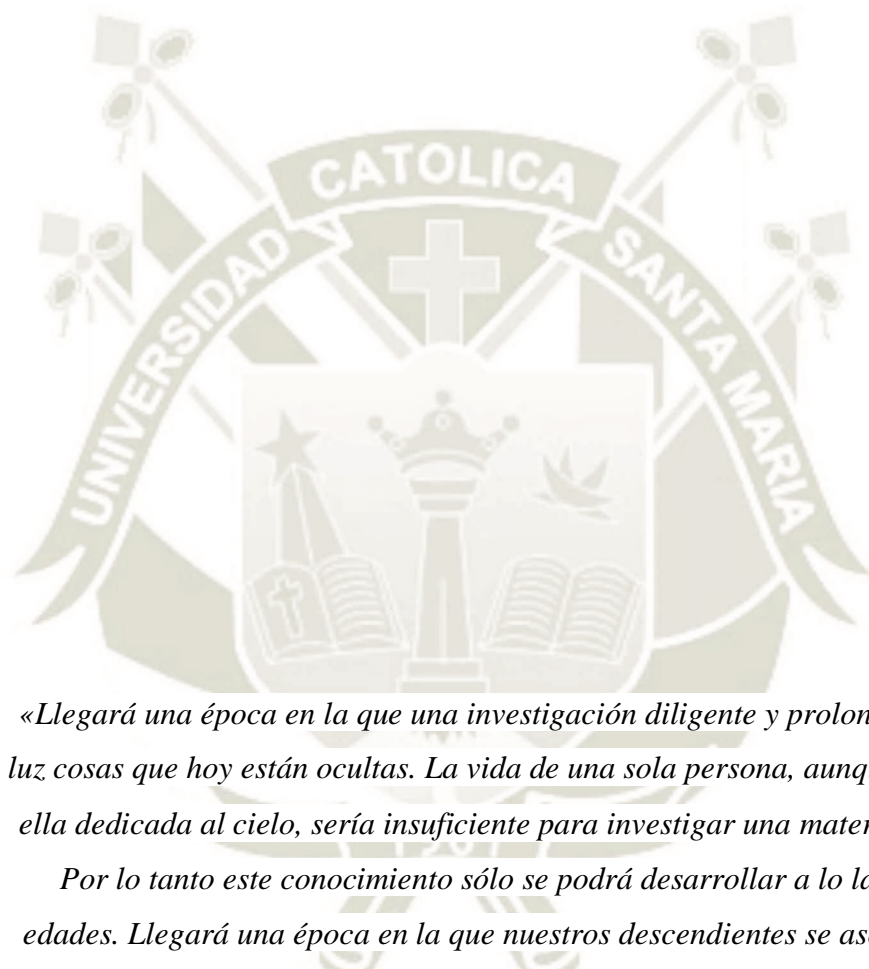
JURADOS: PRESIDENTE **Mgter. Roxana Bardales A.**
VOCAL **Mgter. Fredy Molina R.**
SECRETARIO **Ing. Cinthia Córdova B.**

FECHA **11/10/2018** HORA **19:00 h** LOCAL **SUM Facultad**

FIRMA DEL DECANO  FECHA **02/10/2018**

A la mayor gloria de Dios, al que doy gracias por tanto bien recibido.

En memoria de Genaro Gutiérrez.



«Llegará una época en la que una investigación diligente y prolongada sacará a la luz cosas que hoy están ocultas. La vida de una sola persona, aunque estuviera toda ella dedicada al cielo, sería insuficiente para investigar una materia tan vasta [...].

Por lo tanto este conocimiento sólo se podrá desarrollar a lo largo de sucesivas edades. Llegará una época en la que nuestros descendientes se asombrarán de que ignoramos cosas que para ellos son tan claras... Muchos son los descubrimientos reservados para las épocas futuras, cuando se haya borrado el recuerdo de nosotros. Nuestro universo sería una cosa muy limitada si no ofreciera a cada época algo que investigar... La naturaleza no revela sus misterios de una vez para siempre.»

- Séneca. Cuestiones naturales, libro 7, siglo I.

AGRADECIMIENTOS

A mi abuela, María Romero, por su amor infinito; a mis padres, Miriam Gutiérrez y Alcides Hermoza, por su cariño, comprensión y soporte constante; a mis tíos y demás familiares, por el aliento incondicional; a Jannina Zárate, por su especial acompañamiento espiritual.

A mis amigos, hermanos de pastoral y a cada persona que, en algún momento, me motivaron a continuar con esta investigación; a Rodrigo Ramos, a quien aprecio y respeto por sus importantes aportes en la práctica, retando constantemente a mi curiosidad por la ciencia; a Carolina del Águila y Pamela Navarro, por acompañarme fielmente en esta aventura de compartir, entre risas, las pequeñas frustraciones experimentales en el laboratorio y en la vida.

Al Vicerrectorado de Investigación y al Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María; al Dr. José Villanueva, por la exigencia y asesoramiento basado en su amplia experiencia como investigador, maestro y amigo; a la Ing. Carmen Zeballos, de quien aprendí a trabajar con optimismo y generosidad sin medida; al Q.F. Ricardo Abril, por darme la oportunidad de desarrollar los ensayos de parámetros de este trabajo; a la Ing. Pamela Manrique, por las enseñanzas brindadas para el desarrollo del análisis estadístico; a la Ing. Haruna Barazorda, por su asesoramiento en cuanto a las técnicas de caracterización molecular; al Sr. Froilán y Sra. Sofía, por su amable asistencia en cuanto a requerimientos de equipos y reactivos.

Al lector de este trabajo, gracias por haber llegado hasta aquí.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	xii
HIPÓTESIS	xiv
OBJETIVOS	xv
OBJETIVO GENERAL	xv
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	xv
 CAPÍTULO I	 1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 SUELO	1
1.2 EL PETRÓLEO Y SUS HIDROCARBUROS.....	4
1.3 CONTAMINACIÓN E INFLUENCIA DE HIDROCARBUROS EN EL SUELO	6
1.4 TÉCNICAS DE REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS	9
1.5 MICROORGANISMOS DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS	13
1.6. DEGRADACIÓN MICROBIANA DE HIDROCARBUROS.....	16
1.6.1 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA BIODEGRADACIÓN DE	16
1.7 MECANISMO DE DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DERIVADOS DE PETRÓLEO.....	19
 CAPÍTULO II	 23
MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1 MATERIALES.....	23

2.2 MÉTODOS.....	25
CAPÍTULO III.....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
3.1 CARACTERIZACIÓN FISIQUÍMICA DEL SUELO	33
3.2 OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CONSORCIO NATIVO MIXTO	38
3.3 OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN MEDIO ENRIQUECIDO.....	40
3.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE MICROORGANISMOS FUNCIONALES DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS	44
3.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	47
3.6 ENSAYOS DE PARÁMETROS DE ACTIVIDAD BIODEGRADATIVA..	52
3.7 ENSAYOS DE PARÁMETROS DE ACTIVIDAD DEGRADATIVA DE CONSORCIO NATIVO MIXTO	72
CAPÍTULO IV	78
CONCLUSIONES.....	78
CAPÍTULO V.....	81
RECOMENDACIONES.....	81
CAPÍTULO VI.....	83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
CAPÍTULO VII.....	95
ANEXOS	95

ÍNDICE DE FIGURAS

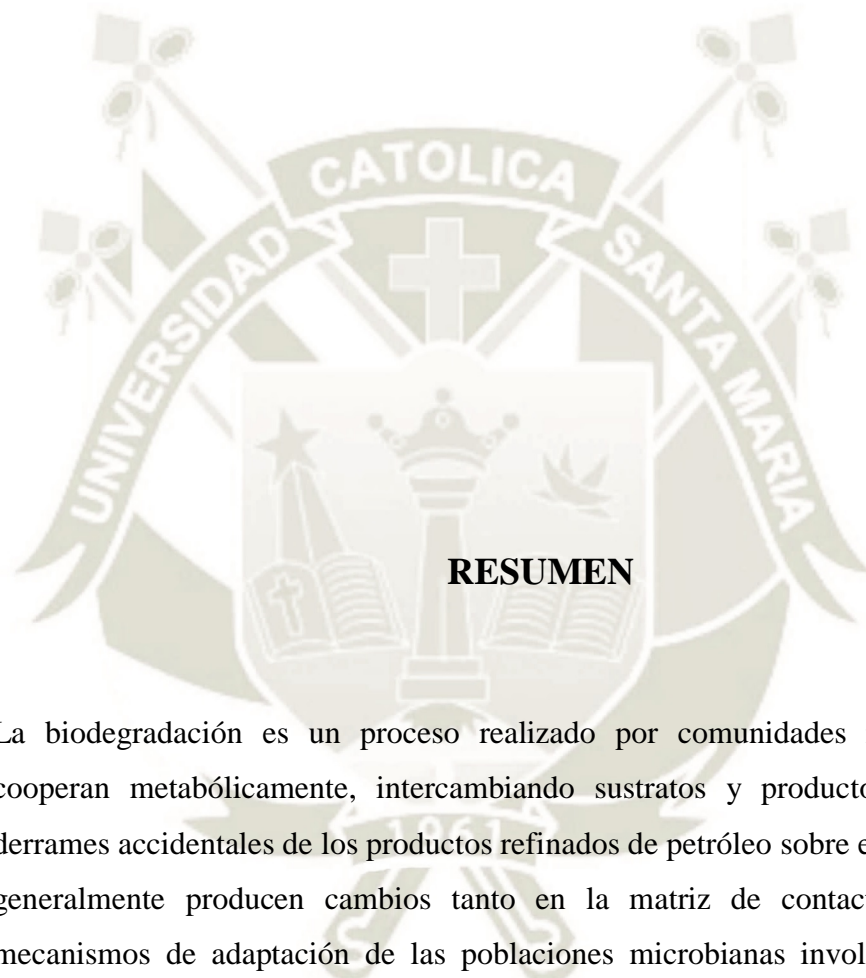
Figura 1. Tasas de degradación de hidrocarburos en suelo, agua dulce y ambientes marinos	18
Figura 2. Principio fundamental de la degradación aeróbica de hidrocarburos por microorganismos	20
Figura 3. Reacciones enzimáticas relacionadas con los procesos de degradación de hidrocarburos.....	20
Figura 4. Diluciones seriadas de consorcio nativo mixto en medio AMDG	39
Figura 5. Población microbiana desarrollada en medio AMG.....	41
Figura 6. Población microbiana desarrollada en medio AMDG.....	41
Figura 7. Colonias Rosadas (CR) aisladas en placa con medio AMDG.....	44
Figura 8. Colonias Blancas (CB) aisladas en placa con medio AMDG	45
Figura 9. Microscopía a 40X de tinción Gram para CR y CB.....	45
Figura 10. Resumen de análisis de alineamiento múltiple en BLAST de la secuencia de CR.....	47
Figura 11. Resumen gráfico de los alineamientos de secuencias nucleotídicas para CR.	48
Figura 12. Análisis taxonómico de los alineamientos de mayor puntuación para cepa CR.	49
Figura 13. Árbol filogenético de secuencia CR.	50
Figura 14. Resumen de análisis de alineamiento múltiple en BLAST de la secuencia de CB.....	51
Figura 15. Resumen gráfico de los alineamientos de secuencias nucleotídicas para cepa CR.....	51
Figura 16. Análisis taxonómico de los alineamientos de mayor puntuación para cepa CB.	51
Figura 17. Árbol filogenético de secuencia CB.	52

Figura 18. Curvas de crecimiento de aislamientos nativos de suelo contaminado, en medio líquido MMDG. Dónde: Cepa R= CR, Cepa B= CB, Blanco R y Blanco B= Blanco de CR y Blanco de CB.....	53
Figura 19. Concentración de microorganismos CR y CB en medio de cultivo	54
Figura 20. Concentración de microorganismos para las cepas CR y CB al día 13...	57
Figura 21. Concentración de diésel con respecto al tiempo en medio de cultivo líquido MMDG para las cepas CR y CB.	61
Figura 22. Concentración de diésel en al día 0 en medio de cultivo MMDG con presencia de cepas CR y CB.	62
Figura 23. Concentración de hidrocarburos en medio de cultivo con cepas CB y CR y sus respectivos blancos al día 13.....	65
Figura 24. Concentración de glucosa en medio de cultivo. Dónde: A) Concentración de glucosa en reactor con Cepa R (CR). B) Concentración de glucosa en reactor con Cepa B (CB).....	68
Figura 25. pH presente en medio de cultivo en presencia de CR y CB.	71
Figura 26. Curva de crecimiento de consorcio nativo mixto en MMGD.	73
Figura 27. Concentración de diésel en presencia de consorcio nativo mixto con respecto al tiempo de degradación.	74
Figura 28. Concentración de glucosa en presencia de consorcio nativo mixto con respecto al tiempo de degradación.	74
Figura 29. pH del medio de cultivo en presencia de consorcio nativo mixto con respecto al tiempo.	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas relacionadas a la degradación de hidrocarburos de petróleo.....	21
Tabla 2. Características fisicoquímica de suelo potencialmente contaminado	33
Tabla 3. Características macroscópicas y microscópicas de colonias aisladas (CR) y (CB).....	46
Tabla 4. Concentración microbiana expresada en cel/mL con respecto al tiempo en días para CR y CB.....	52
Tabla 5. Análisis estadístico descriptivo para la concentración de microorganismos al día 0.....	54
Tabla 6. Análisis de varianza para la concentración de microorganismos CR y CB al día 0.....	55
Tabla 7. Comparaciones múltiples según método (LSD) de Fisher para la concentración de microorganismos al día 0.....	55
Tabla 8. Análisis de varianza para la concentración de microorganismos CR.....	56
Tabla 9. Análisis de varianza para la concentración de microorganismos CB.....	56
Tabla 10. Comparaciones múltiples (LSD) de Fisher para las concentración de microorganismos durante el tiempo experimental.....	57
Tabla 11. Análisis estadístico descriptivo para la concentración de microorganismos al día 13.....	58
Tabla 12. Análisis de varianza para la concentración de microorganismos al día 13.....	58
Tabla 13. Comparaciones múltiples según método (LSD) de Fisher para la concentración de microorganismos al día 13.....	59
Tabla 14. Concentración de hidrocarburos con respecto al tiempo en medio de cultivo MMDG con presencia de cepas CR y CB.....	60
Tabla 15. Análisis estadístico descriptivo para la concentración de diésel al día 0..	61
Tabla 16. Análisis de varianza para la concentración de diésel al día 0.....	62
Tabla 17. Comparaciones múltiples (LSD) Fisher para las concentraciones de diésel en medio de cultivo con Cepa R (CR), Cepa B (CB) al día 0.....	63

Tabla 18. Análisis de varianza de la concentración de diésel en medio de cultivo con microorganismos CR.....	63
Tabla 19. Análisis de varianza de la concentración de diésel en medio de cultivo con microorganismo CB.	64
Tabla 20. Comparaciones múltiples (LSD) de Fisher de la concentración de diésel en medio de cultivo para cepa R (CR) y cepa B (CB).	64
Tabla 21. Análisis estadístico descriptivo para concentración de diésel al día 13... ..	66
Tabla 22. Análisis de varianza para concentración de diésel al día 13.	66
Tabla 23. Comparaciones múltiples (LSD) Fisher para las concentraciones de diésel en medio de cultivo con Cepa R (CR), Cepa B (CB) al día 13.....	67
Tabla 24. Concentración de glucosa en reactores inoculados con cepa R (CR) y cepa B (CB).	68
Tabla 25. pH en reactores con medio de cultivo con Cepa R (CR) y Cepa B (CB). ..	70
Tabla 26. Concentración de microorganismos del consorcio nativo mixto en medio de cultivo líquido MMDG.	72
Tabla 27. Concentración de diésel y glucosa en reactores con presencia de consorcio nativo mixto.	73
Tabla 28. Prueba t-Student para concentración de diésel y glucosa al día 11.....	75
Tabla 29. pH del medio de cultivo MMDG en presencia del consorcio nativo	75

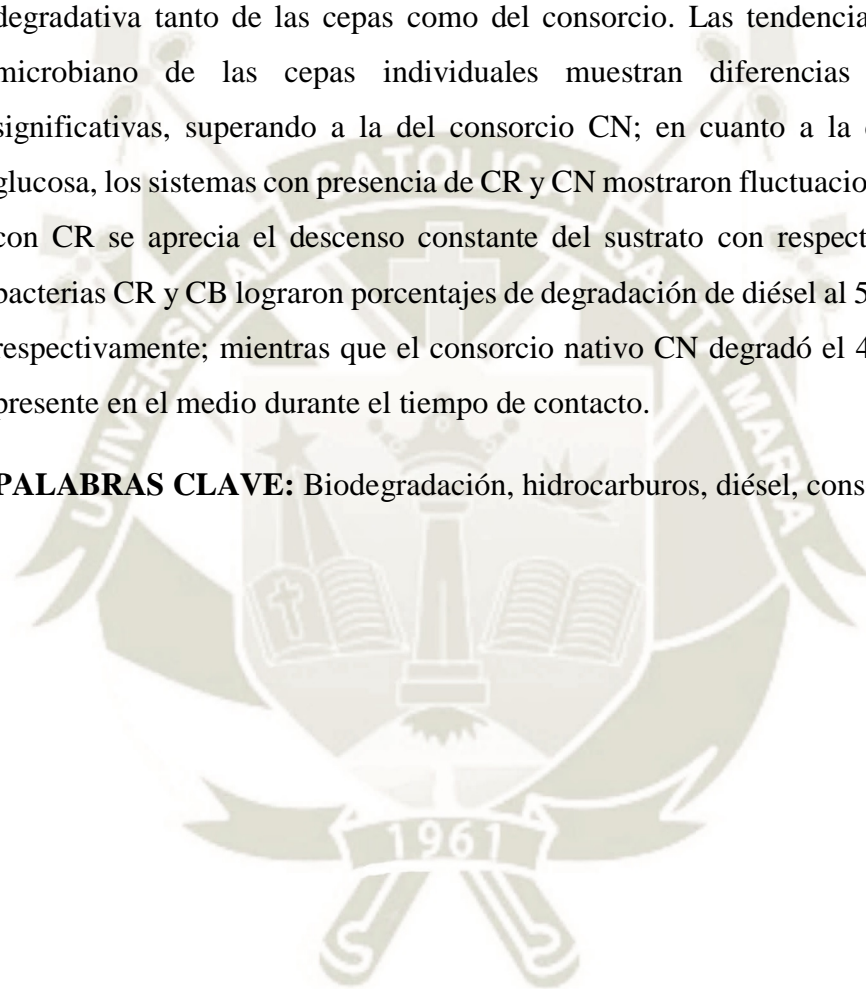


RESUMEN

La biodegradación es un proceso realizado por comunidades microbianas que cooperan metabólicamente, intercambiando sustratos y productos entre sí. Los derrames accidentales de los productos refinados de petróleo sobre el agua y el suelo, generalmente producen cambios tanto en la matriz de contacto como en los mecanismos de adaptación de las poblaciones microbianas involucradas. En esta investigación, se realizó la caracterización fisicoquímica del suelo de un taller mecánico de buses interprovinciales ubicado en el distrito de Cerro Colorado, confirmando la contaminación del mismo debido a que se registró 68597.84 ppm de hidrocarburos presentes. Seguidamente, se llevó a cabo la obtención del consorcio nativo del suelo (CN) mediante cultivo en medio líquido, se realizaron diluciones seriadas y se cuantificó por el método de recuento en placa, obteniéndose una carga microbiana de 57×10^4 UFC/g. Luego, se cultivó el consorcio en medio mínimo mineral suplementado con diésel y glucosa como sustratos, logrando el aislamiento de

dos cepas (CR y CB); ambas cepas fueron caracterizadas macroscópica, microscópica y molecularmente, determinando que CR pertenece al grupo de los *Micrococcales* y CB al de las *Proteobacterias*. Finalmente, con el propósito de identificar el comportamiento de los microorganismos en condiciones adversas con respecto al tiempo, se establecieron sistemas reactores provistos de medio suplementado con diésel y glucosa a pH ácido y se evaluaron los parámetros indicadores de actividad degradativa tanto de las cepas como del consorcio. Las tendencias de crecimiento microbiano de las cepas individuales muestran diferencias estadísticamente significativas, superando a la del consorcio CN; en cuanto a la concentración de glucosa, los sistemas con presencia de CR y CN mostraron fluctuaciones, mientras que con CR se aprecia el descenso constante del sustrato con respecto al tiempo. Las bacterias CR y CB lograron porcentajes de degradación de diésel al 51.27% y 32.84%, respectivamente; mientras que el consorcio nativo CN degradó el 48.78% del diésel presente en el medio durante el tiempo de contacto.

PALABRAS CLAVE: Biodegradación, hidrocarburos, diésel, consorcio nativo, pH.



ABSTRACT

Biodegradation is a process carried out by microbial communities that cooperate metabolically, exchanging substrates and products with each other. Accidental spills of refined petroleum products on water and soil generally produce changes both in the contact matrix and in the adaptation mechanisms of the microbial populations involved. In this research, the physicochemical characterization of the soil of a mechanical workshop of interprovincial buses located in the Cerro Colorado district was carried out, confirming the pollution of the same because 68597.84 ppm of hydrocarbons were present. Then, the native soil consortium (CN) was obtained by means of culture in liquid medium, serial dilutions were made and quantified by the plate count method, obtaining a microbial load of 57×10^4 CFU/g. Then, the consortium was cultivated in mineral minimum medium supplemented with diesel and glucose as substrates, achieving the isolation of two strains (CR and CB); both strains were characterized macroscopic, microscopic and molecularly, determining that CR belongs to the group of *Micrococcales* and CB to that of *Proteobacteria*. Finally, with the purpose of identifying the behavior of microorganisms in adverse conditions with respect to time, reactors systems equipped with medium supplemented with diesel and glucose at acid pH were established and the parameters indicating degradative activity of both strains and consortium. The microbial growth trends of the individual strains show statistically significant differences, surpassing that of the CN consortium; regarding the glucose concentration, the systems with presence of CR and CN showed fluctuations, while with CR a constant decrease with respect to time is observed. The CR and CB bacteria achieved degradation percentages of 51.27% and 32.84%, respectively; while the native CN consortium degraded 48.78% of the diesel present in the medium during the contact time.

KEYWORDS: Biodegradation, hydrocarbons, diesel, native consortium, pH.

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental, uno de los más graves problemas que afecta a nuestro planeta en proporciones exponenciales, es principalmente consecuencia de prácticas industriales inadecuadas que perjudican de forma directa o indirecta a los recursos naturales.

El petróleo y sus hidrocarburos derivados, como el diésel, son utilizados como fuentes de energía en el ámbito industrial; por lo tanto, se ha convertido en una importante causa de contaminación global. Se estima que de 0.08 a 0.46 % de la producción de petróleo en cualquiera de sus formas, termina formando parte de la contaminación ambiental. La deficiente disposición de estos residuos sólidos ha permitido que la acumulación de sustancias tóxicas represente una amenaza para el ecosistema y, de esta manera, provocan episodios contaminantes (1).

Los productos de petróleo refinados más comúnmente comercializados como el queroseno, gasolina, diésel y aceites lubricantes, contaminan el medio ambiente a través de derrames que involucran transporte, fugas de desbordamiento en vehículos automotores, manejo deficiente, fugas de tuberías y fugas de tanques de almacenamiento (2), los que a su vez, por acción de la lluvia o el desplazamiento natural del suelo, transportan las sustancias tóxicas hasta las napas freáticas que en ocasiones son fuentes de agua potable o desembocan en terrenos destinados para la agricultura, campos de cultivo y/o bebederos de animales, causando también el alejamiento y la disminución de la flora y fauna nativa y afectando la salud de las poblaciones locales aledañas. La acidificación y la contaminación son dos amenazas principales para los ecosistemas agrícolas; sin embargo, las respuestas de la comunidad microbiana a la acidificación y contaminación del suelo coexistente son las que permanecen menos exploradas (3).

En la ciudad de Arequipa existe gran cantidad de talleres mecánicos, principalmente en la zona denominada Variante de Uchumayo. Esta zona está rodeada de espacios en donde se desarrollan actividades urbanas, industriales y agrícolas, lo cual la convierte en vulnerable a los distintos efectos de contaminación local por el mal uso de residuos

de hidrocarburos derivados de petróleo y otros aceites o componentes de uso común en el servicio de mantenimiento de vehicular.

La biorremediación es una de las técnicas de recuperación de ambientes contaminados con hidrocarburos, en la cual se utilizan microorganismos como bacterias, hongos y levaduras para remover, transformar o degradar compuestos orgánicos a productos metabólicos menos tóxicos o inocuos para el medio ambiente y la salud humana. Este sistema de descontaminación de suelos está basado en la digestión que efectúan los microorganismos, de la cual obtienen la energía para aumentar en masa celular y cumplir sus funciones metabólicas para promover la recuperación o atenuación natural (4).

El estudio cinético de las cepas aisladas así como el del consorcio mixto a nivel de laboratorio ayuda a la obtención de datos sobre el comportamiento microbiano que están interactuando y que más adelante serán responsables del proceso de degradación, determinando cuales son las condiciones óptimas de crecimiento a partir de los puntos de relación. Los consorcios integrados por bacterias nativas que crecen en un suelo con las mismas condiciones tienen ventajas en términos de adaptabilidad a los factores de crecimiento como la competencia por los nutrientes (5).

El presente trabajo de investigación pretende estudiar el comportamiento de dos cepas bacterianas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos, mediante la evaluación de los parámetros que indican actividad degradativa de diésel, comparándolas el del consorcio nativo mixto del mismo origen de procedencia. Los datos obtenidos en este estudio podrían aportar a futuro, conocimientos necesarios para la aplicación de mejoras en el manejo de recursos en los procesos de biodegradación.



HIPÓTESIS

Dado que existe gran variabilidad de microorganismos capaces de tolerar condiciones ambientales adversas, es posible encontrar microorganismos acidófilos en suelos contaminados con hidrocarburos que tengan la capacidad de degradar diésel de petróleo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de biodegradación de diésel efectuada por microorganismos acidófilos aislados de suelos contaminados con hidrocarburos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar el análisis fisicoquímico del suelo contaminado con hidrocarburos.
2. Aislar, caracterizar e identificar los microorganismos nativos procedentes de suelos contaminados con hidrocarburos.
3. Cuantificar y comparar los parámetros indicadores de actividad degradativa de diésel de las cepas aisladas y del consorcio nativo mixto.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

Se considera contaminante a una sustancia presente en concentración mayor que la natural como resultado de la actividad humana, que tiene un efecto perjudicial neto en uno o varios de los recursos naturales. Cada contaminante se origina en una fuente; la fuente es particularmente importante porque generalmente es el lugar lógico para eliminar la contaminación. Después de que un contaminante es liberado de una fuente, puede actuar sobre un receptor. El receptor es aquello que es afectado por el contaminante (6).

Las demandas de una población en constante crecimiento, unidas con la necesidad de una calidad de vida mejorada, traen como consecuencia la contaminación mundial en una escala masiva. El suelo puede padecer la contaminación y puede involucrar a su vez a producir fenómenos de polución en alguna otra esfera ambiental. Por ejemplo, algunos residuos dañinos que se eliminan inadecuadamente, pueden lixiviarse al agua subterránea que, eventualmente, se libera como agua contaminada en los afluentes (6).

1.1 SUELO

1.1.1 DEFINICIÓN GENERAL

El suelo es la capa fina superior de la corteza terrestre o litosfera, situada entre la superficie y el lecho rocoso, constituido por organismos vivos, agua, aire, materia orgánica y partículas minerales (7).

En términos de ingeniería, el suelo se ha definido como el agregado no cementado de granos minerales y materia orgánica en descomposición junto con el gas y el líquido que ocupan los espacios vacíos entre las partículas sólidas (8).

El suelo representa un componente fundamental del medio ya que en él se asienta la vida vegetal y se desarrolla la mayor parte de las actividades humanas, siendo,

además, la interfaz entre la tierra, el agua y el aire lo que le brinda la capacidad de desempeñar funciones naturales y de uso antropogénico (7).

1.1.2 FORMACIÓN DEL SUELO

Los factores que intervienen en la formación del suelo pueden ser geológicos, climatológicos y biológicos, entre los que cabe destacar (7):

- La lluvia, que participa en la regulación de la humedad, el contenido del aire, el contenido de aire y el grado de lixiviación del suelo. El agua, en forma de una capa fina, rodea las partículas del suelo y es muy importante para el desarrollo de procesos químicos en el medio natural, pues en ella se producen los fenómenos de disolución del suelo (7).
- La atmósfera, que se interrelaciona con el suelo en función de los factores del clima, a través del balance que se da entre la lluvia y evaporación. La concentración de solutos presentes en el suelo son aportados por la lluvia, mientras que la evaporación transfiere agua al medio atmosférico. El balance lluvia- evaporación hace posible la infiltración del agua hacia capas cada vez más profundas alimentando los acuíferos de las zonas subterráneas, en el proceso en el que el suelo interacciona con el agua intercambiando elementos (lixiviación) (7).
- La infiltración del agua edáfica y a la actividad orgánica se produce una estructura secuencias de capas distintas en el suelo, marcadas según la profundidad y características particulares (7).

1.1.3 ESTRUCTURA DEL SUELO

Visualmente, se distinguen tres horizontes en orden decreciente con características y funciones químicas, físicas y biológicas diferentes (7):

- “Horizonte A”, compuesto por materia orgánica (humus) y por partículas minerales que le atribuye una coloración oscura. Los materiales solubles son arrastrados por las aguas que se infiltran (lixiviación) a las zonas inferiores (especialmente las sales de Fe, Mn, Al) y tiene lugar, a la vez, la transferencia de compuestos orgánicos (7).

- “Horizonte B”, en donde se da lugar la acumulación de los lixiviados. Aquí se produce la oxidación de la materia orgánica y una lixiviación moderada. Posee una coloración pardo rojiza debido a que contiene arcillas y óxidos (principalmente Fe III) (7).
- “Horizonte C”, que separa la roca en proceso de meteorización de la roca más profunda sin alterar (7).

1.1.4 COMPOSICIÓN DEL SUELO

En cuanto a la composición del suelo, esta está determinada, en gran parte, por el tipo de materia originaria (roca). A este material se va añadiendo, durante el tiempo de formación de un suelo, materia orgánica que procede de los organismos vivos. La fertilidad de un suelo está determinada por el contenido mineral que posee. En términos medios, la composición volumétrica en un suelo es la siguiente (7):

- 50% de materia sólida: 45% mineral y 5% orgánica.
- 20-30% disolución acuosa.
- 20-30% de aire.

El suelo posee dos tipos de constituyentes:

- **Componentes Inorgánicos:** Derivan de la meteorización, se clasifican en gravas, arenas y arcillas de acuerdo a su tamaño y naturaleza. La cantidad de cada una de ellas constituye la textura de un suelo. Está compuesto por partículas minerales (silicatos y óxidos) y en los poros también hay agua y aire (7).
- **Componentes Orgánicos o Humus:** Resulta de la descomposición de los seres vivos producida por las bacterias y hongos. Su presencia confiere calidad al suelo, retiene agua y funciona como alimento para otros microorganismos (7).

1.2 EL PETRÓLEO Y SUS HIDROCARBUROS

El petróleo es un combustible natural que procede de la transformación lenta de fósiles del subsuelo (peces, algas y plancton) generada a temperaturas no muy altas y a elevadas presiones. Puede ser obtenido de piedras calizas ubicadas en las capas superiores de la tierra bajo rocas no porosas que ejercen presión. Cuando un yacimiento es perforado, el petróleo emerge a la superficie debido a la presión ejercida por los gases que lo constituyen; cuando la presión disminuye, debe ser extraído por bombas o aplicando reinyección de gas desde el exterior. Químicamente, está constituido por una mezcla de diversos tipos de hidrocarburos que contienen básicamente átomos de carbono e hidrógeno en su estructura y están dispuestos generalmente en cadenas largas, cortas o adoptan otro tipo de formas cíclicas. Estos pueden ser obtenidos mediante destilación fraccionada, un procedimiento en el cual es posible separar los componentes de una mezcla teniendo en cuenta su volatilidad y sus puntos de ebullición (9); además, puede presentar compuestos sulfurados, oxigenados y nitrogenados que no llegan a superar el 5% del total (10). No existe una composición exacta de los componentes del petróleo, esto depende del lugar en dónde se encuentre el yacimiento, pues en algunos sitios de extracción predomina petróleo rico en alcanos (Salta - Argentina), petróleo rico en hidrocarburos aromáticos (Comodoro Rivadavia - Argentina) o gran proporción de cicloalcanos (El Cáucaso – Rusia) (9).

Se pueden dividir en cuatro categorías:

- I. Hidrocarburos Saturados: alcanos como es el caso del hexano, el octano, el decano, el hexadecano, los isoalcanos y los cicloalcanos como el ciclohexadecano (11).
- II. Hidrocarburos Aromáticos: se encuentra el benceno, tolueno, xileno y naftaleno agrupados también bajo la apelación BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) y los poliaromáticos o HAP's (Hidrocarburos aromáticos policíclicos) (11).
- III. Resinas: son sólidos amorfos polares disueltos que contienen oxígeno, nitrógeno y azufre (11).

- IV. Asfaltenos: grandes moléculas coloidales polares no disueltas que tienen la característica de ser más resistente a la biodegradación (12).

Los hidrocarburos que forman parte del petróleo crudo tienen distintas propiedades que los caracterizan, dependiendo del número de átomos de carbono y de su estructura molecular. Las cadenas lineales carbonadas asociadas a hidrógeno constituyen los alcanos o parafinas; cuando se tratan de cadenas ramificadas se tienen las isoparafinas; al presentarse dobles enlaces de unión entre los átomos de carbono se forman las olefinas o alquenos; también están los alquinos que establecen triple unión o enlace; las moléculas conocidas como naftenos son en las que se forman ciclos de carbono, cuando estos ciclos presentan dobles enlaces alternos (anillo bencénico) se tiene la familia de hidrocarburos aromáticos (13).

En términos generales, la fracción de hidrocarburos saturados y aromáticos son degradables de un 70 a 97 % y lo demás representa la cantidad de asfaltenos y resinas fundamentalmente inertes (14).

Cada categoría agrupa compuestos con características de volatilidad, solubilidad y toxicidad propias. En cuanto a biodegradabilidad, los hidrocarburos pueden ordenarse de mayor a menor biodegradabilidad de la siguiente manera: alcanos lineales > alcanos ramificados > aromáticos ligeros > alcanos cíclicos > aromáticos pesados > compuestos polares (15) (16).

Los alcanos o parafinas son moléculas químicamente estables cuya estructura se encuentra saturada de hidrógeno. Pueden ser de estructura lineal, ramificada o cíclica. Los alcanos ramificados constituyen la mayor parte del petróleo; estos son degradados más lentamente y después que los de cadena lineal (10). Los más tóxicos son los de cadena corta, los de cadena larga son más hidrofóbicos (11). El hexadecano, es un sustrato selectivo ideal para la obtención y el aislamiento de microorganismos que tienen la capacidad de degradar alcanos (17).

Los compuestos aromáticos y poliaromáticos se caracterizan por sus productos de degradación intermediarios muy contaminantes, son más solubles que otros

hidrocarburos y suelen contaminar las aguas subterráneas (18). Están constituidos por tres o más núcleos bencénicos que eventualmente se asocian con cadenas lineales. Su acumulación en el ambiente se produce debido a su estabilidad química, la baja solubilidad que tiene en el agua y la fuerte adsorción a las partículas del suelo (19).

1.1.5 DIÉSEL

El diésel es una mezcla combustible de hidrocarburos saturados (33% m/m), aromáticos (8% p/p) y azufre (400 ppm) (15), cuyo contenido de carbono está entre C10 y C22, es considerado entre los hidrocarburos de fracción media (20).

El petróleo crudo se procesa en las refinerías con el fin de transformarlo en productos derivados, como lo son el gas licuado de petróleo (GLP), combustible diésel o gasoil, materias primas de petroquímicos, aceite combustible, gasóleo de calefacción. Esto se realiza a partir de la separación en fracciones de contenido de carbono particular y un punto de ebullición único para cada producto. En el interior de las torres de destilación, los líquidos y los vapores son separados en fracciones conforme a su peso molecular y temperatura de ebullición. Las fracciones que son más ligeras como las gasolinas y GLP, vaporizan y luego se condensan al ascender hasta la parte superior de la torre. Los líquidos como el kerosene y el diésel, que son medianamente pesados, se quedan en la parte intermedia, mientras que los más pesados se quedan en el fondo (20).

1.3 CONTAMINACIÓN E INFLUENCIA DE HIDROCARBUROS EN EL SUELO

El suelo contiene partículas orgánicas e inorgánicas con distintas características tanto físicas como químicas que dependen de la temperatura, clima, altitud y latitud (7).

Un suelo contaminado se puede definir como aquel cuyas características físicas, químicas o biológicas han sido afectadas negativamente por la presencia de componentes peligrosos de origen humano, en concentración tal que represente

un riesgo para la salud humana o el medio ambiente, esto de acuerdo a los estándares de calidad de suelo establecidos por el gobierno (7).

La contaminación del suelo con hidrocarburos imposibilita el uso de este para actividades de desarrollo como la agricultura y la urbanización, y adicionalmente compromete las napas freáticas que en algunas localidades constituyen una fuente importante de agua potable. Por ello es importante la remediación ambiental en estos suelos (21).

Los compuestos orgánicos interactúan con las partículas de suelo, tanto a través de interacciones físicas como mediante la formación de enlaces químicos (22), por ejemplo fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, intercambio de aniones, intercambio catiónico y/o interceptación física (23).

Las partículas del suelo están dispuestas en forma de agregados cuyas propiedades explican el tipo de absorción y adsorción de los contaminantes (24). Al entrar en contacto con las partículas de suelo, los hidrocarburos se adsorben a ellas y modifican sus propiedades. Los agregados se vuelven más estables porque se endurecen con el tiempo, se vuelven más hidrofóbicos, disminuyen su porosidad y su contenido de aire (25).

El tamaño de las partículas también influye en la absorción. Las partículas más pequeñas tienen mayor área superficial y los diversos tamaños de partículas pertenecen a variados minerales con características distintas (23). Las arcillas presentan mayor cantidad de superficies activas a comparación de las arenas, lo que posibilita que los hidrocarburos sean absorbidos y posteriormente acumulados en el suelo. En el caso de los suelos arenosos, poseen pocas superficies activas y el drenaje es eficiente, lo que evita la acumulación del contaminante en las zonas más superficiales del suelo y permiten el movimiento negativo del hidrocarburo hacia la profundidad (26).

Un parámetro de importancia que influye en la absorción es la temperatura, pues para gran parte de los compuestos en el suelo, la absorción disminuye al aumentar la temperatura (23).

La interacción de la absorción también depende del tiempo. A mayor tiempo que transcurrido desde que el compuesto está en contacto con las partículas edáficas, el proceso de remediación será más largo y más difícil debido a la fuerte absorción entre el hidrocarburo con las partículas de suelo (23).

Se han hecho estudios acerca de las propiedades tanto físicas como químicas en suelos arcillosos, analizando si luego de la contaminación, existían modificaciones en la textura, porosidad, densidad aparente, pH y conductividad eléctrica. Las características del hidrocarburo tales como el carácter químico, configuración, solubilidad, distribución de la carga, polarización y tamaño molecular también influyen en el tipo de absorción. Por lo tanto, es necesario estar al tanto de la influencia del hidrocarburo sobre el suelo, teniendo en cuenta que los suelos, en su estado natural, tienen propiedades específicas y que son alteradas de acuerdo al tipo y concentración del material contaminante (27).

De forma similar, en otra investigación desarrollada por PALA et al. (2002) (28) en Brasil, se comprobó la variación en las características de un suelo de tipo arcilloso contaminado con petróleo crudo. Los parámetros experimentados fueron densidad, fósforo disponible, pH, nitrógeno total, carbono orgánico y contenido de petróleo en el suelo, siendo los dos últimos parámetros indicadores de contaminación por presencia de hidrocarburos (28).

Desde el punto de vista microbiológico, Jones (1997), que fue citado por Okpokwasili y Amanchukwu (29), observó la variación de población bacteriana de un suelo afectado con hidrocarburo al compararlo con un suelo control (sin contaminante). No obstante, la actividad de ciertos microorganismos no fue perjudicada por la contaminación (29).

Las modificaciones físicas y químicas ocasionadas por la contaminación ocasionan un gran desequilibrio en el suelo, de tal manera que toda clase de vida (animal, vegetal y microbiana), se ve restringida en cantidad y diversidad lo que puede ocasionar su rápida desaparición. Es por esto que resulta fundamental conocer los distintos efectos de los contaminantes sobre los suelos para iniciar la

planificación de cualquier sistema de remediación de superficies de tierra perturbadas por derrames o confinamientos de petróleo o sus derivados (30).

1.4 TÉCNICAS DE REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

Los procedimientos más comunes para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos son:

1.4.1 TRATAMIENTOS FÍSICOS

Los tratamientos físicos requieren técnicas que utilizan los parámetros físicos como la temperatura o la presión para lograr la descontaminación del suelo. Al recuperar el contaminante, este es tratado para disminuir el peligro que constituye. Existen múltiples alternativas (31):

- La contención: Cuando se confina o controla el volumen del contaminante con la utilización de materiales impermeables o solidificantes como cemento, cenizas de silicio o calcio o polímeros orgánicos. Estas alternativas sólo aísla e impide la expansión de la contaminación (31).
- Extracción bajo vacío (venting): Para hidrocarburos volátiles, es posible provocar una depresión en el suelo que permita aspirar el contaminante, adsorberlo a un soporte para gases y propiciar su transformación, ya sea por oxidación térmica o catalítica (31).
- Desorción térmica: Se debe escavar el suelo contaminado y colocarlo a 600 – 800 °C para desorber el agua y los contaminantes presentes. Esto involucra el desplazamiento del suelo, implicando a su vez altos costos económicos (31).
- Incineración: Se coloca el suelo a 1000 y 1100 °C y después se tratan el gas y las cenizas (31).
- Vitricificación: En el suelo contaminado se colocan electrodos de carbono, los cuales generan temperaturas altas de 1500 – 1600 °C, haciendo que el contenido del suelo se derrita y vitrifique (31).

1.4.2 TRATAMIENTOS QUÍMICOS

Las técnicas aplicadas en los tratamientos químicos requieren de un compuesto químico que es suministrado al suelo para reaccionar con el contaminante ya sea destruyéndolo o transformándolo. En ocasiones, este reactivo puede convertirse en un nuevo contaminante en el caso que sea de naturaleza muy recalcitrante o que se haya agregado en grandes cantidades. En los tratamientos aplicados en suelos contaminados con hidrocarburos, por lo general se requiere agregar sustancias que faciliten la interacción con las moléculas hidrófobas del hidrocarburo, aunque también se pueden utilizar otros métodos como (31):

- Inmovilización química y quelación: Existen contaminantes que pueden estabilizarse con ayuda de otras sustancias aplicadas en el suelo para formar complejos por inundación o nebulización (31).
- Extracción con fluidos supercríticos: Se inyectan al suelo gases como el propano, butano o gas carbónico licuados a temperatura y presión críticas, de forma que ocupe todo el espacio. Cuando estos gases se volatilizan conducen con ellos a los contaminantes (31).
- Oxidación química: Se incorporan al suelo sustancias oxidantes como el peróxido de hidrógeno para que oxiden los materiales contaminantes y puedan disminuir su toxicidad (31).

1.4.3 TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS

Los tratamientos biológicos, también llamados tratamientos de biorremediación, son un tema importante en la investigación de suelos contaminados con hidrocarburos, se han desarrollado y perfeccionado estrategias para aplicarlos en el tratamiento de suelos que básicamente consisten en la aceleración del proceso natural de biodegradación que efectúan los microorganismos que convierten moléculas orgánicas en CO₂, agua o metano (32).

Los hidrocarburos pueden servir como fuente de carbono y energía para el desarrollo de diferentes microorganismos que puedan colonizar las zonas contaminadas y tengan la capacidad de degradar el agente contaminante (33).

Cuando la biorremediación se efectúa directamente sobre el sitio contaminado se hablará de una biorremediación *In Situ*. Si el tratamiento se da en otro lugar, luego de haber excavado y transportando los suelos contaminados, se tratará de una biorremediación *Ex Situ*. Sin embargo, el desplazamiento del suelo afectado por contaminación puede perturbar la capacidad autorremediante de los ecosistemas, por lo que la biorremediación *In Situ* es considerada como el procedimiento menos invasor (16).

a) **Biorremediación *In Situ***

La biorremediación *In Situ* se utiliza en el sitio mismo de la contaminación, favorece la destrucción del contaminante sin producir perturbaciones colaterales irreversibles. También se adapta a las altas concentraciones y heterogeneidad de la contaminación así como a la versatilidad de las condiciones ambientales durante el tiempo en que se aplica el tratamiento (34).

- **Biolabranza:** Se mezcla el suelo contaminado con agentes de volumen, realizándose una labranza con cierta periodicidad de tiempo que permite favorecer la aireación. Dentro de los beneficios se considera que es un proceso de bajo nivel tecnológico, que no presenta exigencias de ingeniería, y las variables de operación son fáciles de controlar. Entre sus inconvenientes está que necesita de grandes extensiones de área, otra de las desventajas que puede presentar es que si los hidrocarburos son livianos tenderán a volatilizarse, provocando contaminación en el aire (35).
- **Bioaireación:** Radica en suministrar oxígeno al subsuelo estimulando la degradación por medio de la microflora nativa, es una de las técnicas *in situ* más costo-efectivas para contrarrestar derrames de hidrocarburos, ya que el aire es proporcionado mediante un sistema de inyección, no necesita de maquinaria pesada ni demanda grandes excavaciones u otras áreas para efectuar el tratamiento. No obstante, entre los obstáculos que presenta está que si los contaminantes tienen una baja solubilidad en agua, pueden disminuir el contenido de humedad del suelo; a su vez, si el suelo tiene excesiva humedad dificulta la penetración del aire a través la zona afectada por la contaminación (36).

- Bioestimulación: Consiste en la estimulación de los microorganismos autóctonos para activar e impulsar la degradación de los contaminantes. Se puede efectuar adicionando agua, oxígeno, nutrientes como el nitrógeno y fósforo, aceptores de electrones, entre otros parámetros que contribuyan con el desarrollo de los microorganismos. El nitrógeno es necesario para la producción de aminoácidos y enzimas, mientras que el fósforo participa en la formación de compuestos energéticos intracelulares requeridos en los procesos de reproducción y degradación. Los fertilizantes que se utilizan pueden ser de origen orgánico o agrícola (37).
- Bioaumentación: Radica en la adición de cepas de microorganismos externos al suelo, modificados genéticamente y que cuentan con la capacidad de adaptarse y degradar el contaminante. Este tipo de tratamiento no requiere de un área del terreno adicional ni de maquinaria pesada; como inconvenientes están la inoculación a gran escala, la competencia con otros microorganismos nativos y la variación de las condiciones climáticas a las que puedan estar expuestos en el suelo a tratar (38).

b) Biorremediación Ex Situ

La biorremediación Ex Situ permite vigilar el proceso de degradación del contaminante bajo óptimas condiciones de control y parámetros de descomposición examinados con el fin de obtener todos los datos de estudio necesarios para su aplicación en el sitio (16).

- Compostaje: Se trata de un proceso biológico llevado a cabo bajo condiciones controladas, que se distingue de los sistemas convencionales de compostajes, ya que son sistemas cerrados similares a incubadoras que permiten asegurar el uso de elevadas temperaturas ($>70\text{ }^{\circ}\text{C}$) cumpliendo con requisitos para el control de patógenos. También permite la supervisión de otros parámetros como el contenido de humedad, las proporciones de mezcla de nutrientes para promover la actividad de los microorganismos y la degradación del contaminante. La aplicación de esta estrategia tiene dos objetivos: incrementar la eliminación del contaminante y producir un producto maduro que pueda servir en la restauración del suelo para uso industrial (39).

- Biorreactores: Puede utilizarse para el tratamiento de suelos con alto contenido de arcilla y materia orgánica, de baja permeabilidad y poca conductividad hidráulica, se caracteriza porque el contacto es sólido-líquido, el suelo es dispuesto en tanque cerrados, adicionando nutrientes, agua, oxígeno, microorganismos procedentes de cultivos previos y mezclándose para que la degradación se lleve a cabo. Como inconveniente, esta estrategia es más costosa y se debe aplicar un tratamiento al agua resultante de la separación del líquido y el suelo, no es factible para contaminantes volátiles (40).

1.5 MICROORGANISMOS PROCEDENTES DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

Los microorganismos (bacterias, hongos, levaduras, algas) son determinantes en el proceso de biodegradación de hidrocarburos presentes en el suelo pues, mediante su actividad bioquímica, tienen la capacidad de oxidar los hidrocarburos. Existen microorganismos que metabolizan un número limitado de hidrocarburos, por lo que muchas veces es necesaria la presencia de poblaciones mixtas con distintas capacidades metabólicas que puedan degradar mezclas complejas como el crudo de petróleo. La degradación de los hidrocarburos es principalmente llevada a cabo por las bacterias, seguidas por los hongos y levaduras, entre otros (41).

El suelo no sólo provee la materia necesaria para la síntesis celular de los microorganismos sino que también aporta la energía para que puedan realizar sus actividades vitales. El ambiente en el que se desarrollan los microorganismos va a ser determinado por las características físicas y químicas del suelo en el que se encuentren; así como la composición cuantitativa y cualitativa de la comunidad microbiana (42).

Los consorcios de microorganismos procariontes y eucariontes están involucrados en la degradación de los hidrocarburos del petróleo. En los ecosistemas acuáticos, los organismos dominantes en la degradación de compuestos derivados del petróleo son las bacterias y las levaduras, mientras que los que dominan en los

procesos de degradación en suelos son las bacterias y los hongos. Esta biodegradación es realizada por microorganismos equipados con la maquinaria metabólica necesaria para utilizar el contaminante como fuente de carbono y transformarlo en energía para su crecimiento, produciendo biomasa, subproductos, dióxido de carbono y agua (43).

Numerosos estudios permiten constituir una lista de 160 géneros de microorganismos degradadores de hidrocarburos (44) (39), los consorcios más utilizados incluyen especies como *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* y en menor frecuencia *Mycobacterium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula* y *Candida*. Las bacterias han sido más empleadas a comparación de los hongos y las levaduras (12).

Es necesario estudiar qué poblaciones de microorganismos se encuentran en el suelo contaminado ya que es probable que se hayan adaptado a ese ambiente (21).

1.5.1 BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTAS

Las bacterias son organismos microscópicos, procariotas, unicelulares, sin núcleo, rodeados por una membrana lipídica, que conforman un grupo muy diverso de organismos, predominando sobre otros microorganismos en el suelo (45). Es muy complejo determinar el número total de bacterias en el suelo, sólo es posible definir algunas poblaciones (46).

Las bacterias necesitan de nutrientes para generar su propia energía y multiplicarse, además requieren de un medio químico y físicamente apropiado para vivir. La temperatura, el pH, presión parcial de oxígeno y la presión osmótica del ambiente son esenciales para que las bacterias puedan sobrevivir (45). Es así que se pueden mencionar dos poblaciones grandes de bacterias presentes en los suelos vinculados estrechamente con sus propiedades: bacterias autóctonas y bacterias alóctonas (46).

Las poblaciones autóctonas, como su nombre lo indica, son nativas residentes del suelo, están en la capacidad de presentar estados de resistencia y persistir por

largos periodos de tiempo en el suelo de origen en donde pueden crecer, sobrevivir y efectuar sus actividades metabólicas provistas de características adaptativas que las hacen fisiológicamente compatibles con el ambiente físico y químico que ocupan (46). En cambio, las poblaciones alóctonas son miembros temporales de un hábitat y no ocupan los nichos funcionales del ecosistema. Se trata de microorganismos que se han desarrollado en otro lugar y han sido transportados a un ecosistema que les resulta extraño, por lo que es probable que haya variabilidad en cantidad de especies en el tiempo, mientras que otras pueden adaptarse y perdurar durante periodos de tiempo significativos (47).

Hay una gran diversidad de microorganismos que degradan los hidrocarburos derivados de petróleo y, aunque no han sido caracterizados en su totalidad, se sabe que realizan actividades de peroxidasas y oxigenasas que hace posible la oxidación de algunas fracciones del petróleo. Esta oxidación permite que el compuesto se vuelva susceptible a ataques secundarios y también facilita su conversión a bióxido de carbono y agua. A veces no es necesario llegar a la mineralización y basta con la oxidación para que la toxicidad disminuya o la solubilidad en agua aumente, incrementando su biodisponibilidad (48).

La microflora nativa pueden ser sensible a la actividad de poblaciones extranjeras especializadas, esto debido a sus diferencias metabólicas, pues las poblaciones extranjeras pueden producir metabolitos intermediarios que resultan siendo tóxicos para las poblaciones nativas o no son capaces de realizar la descontaminación con la misma eficiencia (33).

Para comprender la actividad de microorganismos que degradan compuestos a los que no han estado expuestos antes, se tiene en cuenta que lo más importante para cualquier organismo vivo es reproducirse y perpetuar sus genes. Cualquier cambio o modificación de las condiciones ambientales o nutricionales que ponga en riesgo la posibilidad de reproducirse, provocará una reacción inmediata a nivel metabólico y luego a nivel genético (49).

1.6 DEGRADACIÓN MICROBIANA DE HIDROCARBUROS

La degradación microbiana de hidrocarburos de petróleo es un proceso complejo que depende de la naturaleza y de la cantidad de hidrocarburos presentes en el medio (50).

Los hidrocarburos difieren en su susceptibilidad al ataque microbiano. La susceptibilidad de los hidrocarburos a la degradación microbiana se puede clasificar de la siguiente forma: alcanos lineales > alcanos ramificados > aromáticos pequeños > alcanos cíclicos o cicloalcanos. Algunos compuestos de alto peso molecular como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP's), pueden no ser degradados en su totalidad (51).

La degradación microbiana es el mecanismo natural, principal y el último por el cual es posible limpiar los contaminantes de petróleo y sus derivados del medio ambiente (51).

Estudios realizados muestran la biodegradación de compuestos aromáticos de alquilo en sedimentos marinos que ocurrieron antes de la biodegradación detectable en el perfil del n-alcano del crudo de petróleo. Los microorganismos encontrados implicados en la degradación alquilo aromática fueron: *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Burkholderia* (52)

1.6.1 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DERIVADOS DE PETRÓLEO

c) Composición Química

Los hidrocarburos pueden ser clasificados de la siguiente manera: Saturados, aromáticos, asfaltenos (fenoles, ácidos grasos, ketonas, ésteres y porfirinas). La susceptibilidad de los hidrocarburos al ataque microbiano difiere y anteriormente han sido clasificados según el siguiente orden de susceptibilidad: n-alcanos > alcanos ramificados > compuestos aromáticos de bajo peso molecular > alcanos cíclicos (53).

d) Estado físico

La dispersión de hidrocarburos en agua forma emulsiones, provocando el aumento de la superficie del contaminante expuesto al ataque microbiano (54). La producción de biosurfactantes por bacterias y hongos permite la formación de emulsiones en el proceso de captación de hidrocarburos (55). Las diferencias entre la biodegradación de hidrocarburos en suelo y agua que mencionan, están relacionadas con el movimiento y la distribución del contaminante, así como la presencia de partículas que pueden afectar la naturaleza física y/o química del hidrocarburo. La infiltración de hidrocarburos en el suelo, generalmente de movimiento vertical, evita las pérdidas por evaporación de los compuestos volátiles, que pueden ser tóxicos para los microorganismos. Las partículas pueden reducir, por absorción, la toxicidad efectiva de los componentes del petróleo, pero la absorción y adsorción de hidrocarburos a sustancias húmicas probablemente contribuyen a la formación de residuos persistentes (56).

e) Concentración

Los alcanos largos ($\geq C_{12}$), los cuales tienen solubilidades menores a 0.01 mg/L, presentan velocidades de degradación que exceden las tasas de disolución de hidrocarburos (54) y están dadas en función de la superficie del contaminante para su emulsificación o fijación física por células (57,58) . Por lo tanto, para muchos hidrocarburos, la biodegradación no depende directamente de la concentración de este en el medio; sin embargo, altas concentraciones de hidrocarburos pueden causar la inhibición de la biodegradación por la limitación de nutrientes, oxígeno o por los efectos tóxicos ejercidos por los hidrocarburos volátiles que no se puedan liberar (59).

f) Temperatura

La temperatura influye en la biodegradación del petróleo por su efecto sobre la naturaleza física y la composición química del aceite, la tasa de metabolismo de los hidrocarburos por los microorganismos y la composición de la comunidad microbiana. A bajas temperaturas, la viscosidad aumenta, mientras que la

volatilidad de tóxicos de bajo peso molecular se ven reducidos, retrasando la actividad degradativa. A su vez, la temperatura puede afectar también la solubilidad del compuesto que se va a degradar. A pesar de que la biodegradación de hidrocarburos puede ocurrir en un amplio rango de temperaturas, las tasas de degradación disminuyen con el decremento de la temperatura. En la bibliografía se puede apreciar que los más altos niveles de biodegradación se producen en los rangos de 30 a 40 °C en suelos, de 20 a 30°C en agua dulce y entre 15 a 20 °C en ambientes de agua salada (60).

g) Nutriente

El nitrógeno, fósforo y oxígeno, son elementos importantes para que suceda el proceso de biodegradación de contaminantes derivados de hidrocarburos (61). Investigaciones reportan que fue necesaria la adición de nutrientes para mejorar la biodegradación de los contaminantes tanto en ambientes marinos como en humedales de agua dulce (62,63). Por otro lado, las elevadas concentraciones de nutrientes NPK (nitrógeno, fósforo y oxígeno) también pueden disminuir la actividad biodegradativa de hidrocarburos, especialmente en los aromáticos (64).

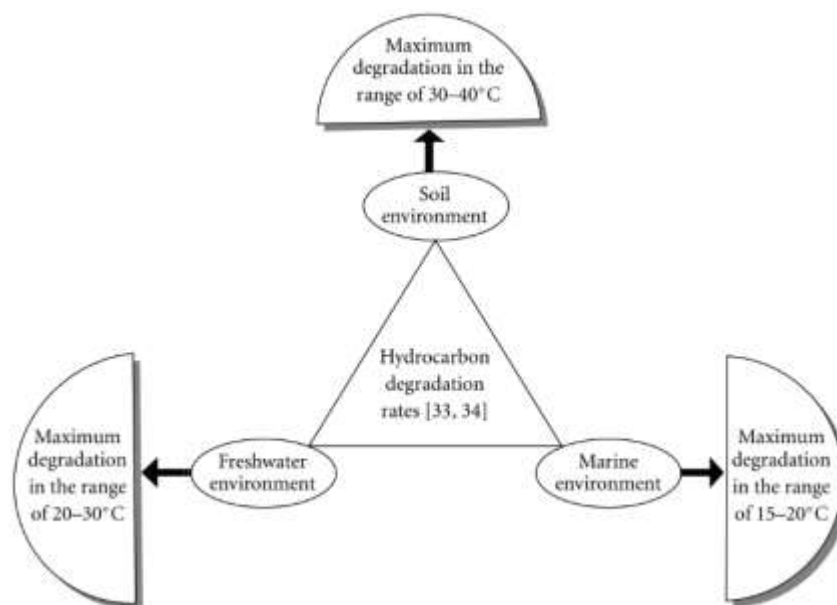


Figura 1. Tasas de degradación de hidrocarburos en suelo, agua dulce y ambientes marinos (65)

h) pH

A diferencia de gran parte de los ambientes acuáticos, se puede encontrar gran variabilidad en el pH del suelo, desde 2.5 en depósitos de despojos mineros hasta 11.0 en desiertos alcalinos (66). El desarrollo de algunas bacterias y levaduras es favorecido cuando se encuentran en medios con pH cercano a la neutralidad; sin embargo, los hongos son más tolerantes a las condiciones ácidas (67). Verstraete et al. reportan mejores resultados de tasa biodegradativa y mineralización en suelos inicialmente ácidos de pH 4.5 y que luego fueron ajustados a pH 7.4 (68).

1.7 MECANISMO DE DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DERIVADOS DE PETRÓLEO

Los compuestos hidrocarbonados pueden ser degradados de forma más rápida y completa cuando están en condiciones aeróbicas. La **Figura 2** indica el principio fundamental que ocurre durante la degradación aeróbica de los hidrocarburos en microorganismos (69). Inicialmente, el ataque intracelular inicial de los contaminantes se debe a un proceso de oxidación y activación; siendo clave la incorporación de oxígeno mediante una reacción enzimática que es catalizada por enzimas oxigenasas y peroxidasas. Existen rutas de degradación periféricas que, paso a paso, convierten los contaminantes orgánicos en compuestos intermedios de las rutas centrales del metabolismo intermediario, por ejemplo, la del ciclo del ácido tricarboxílico. La biosíntesis de la biomasa celular se produce a partir de los metabolitos precursores centrales, por ejemplo, el acetyl-CoA, succinato, piruvato. Los azúcares necesarios para las diversas síntesis biológicas y de crecimiento son sintetizados previamente por la gluconeogénesis. En la **Figura 3** se puede observar que para que los microorganismos puedan degradar alcanos primero deben de oxidar con oxígeno el último carbono de la molécula gracias al complejo multienzimático que no hacen más que incorporar esta molécula de oxígeno. Así se obtiene un hidrocarburo con un grupo alcohol siendo así una molécula más reactiva. Mediante otras enzimas este grupo alcohol se oxida más hasta grupo aldehído y finalmente carboxílico. Así se obtiene una molécula similar a un ácido graso y puede ser degradado a acetyl-CoA por β -oxidación. Este proceso de oxidación también puede darse en carbonos no terminales dando lugar a dos ácidos grasos que se procesarán por β -oxidación (65).

Las alcohohidroxilasas del citocromo P450 constituyen una súper familia de monooxigenasas hemi-tioladas que desempeñan un papel importante en la degradación microbiana del petróleo, los hidrocarburos clorados, los aditivos del combustible y muchos otros compuestos (72). Dependiendo de la longitud de la cadena, se requiere que los sistemas enzimáticos introduzcan oxígeno en el sustrato para iniciar la biodegradación **Tabla 1**. Existe un gran número de formas P450 individuales que pueden contribuir como un conjunto de isoformas a la conversión metabólica de un sustrato dado. En los microorganismos, esta multiplicidad P450 sólo puede encontrarse en pocas especies (73).

Los sistemas enzimáticos de citocromo P450 están relacionados con la biodegradación de hidrocarburos de petróleo **Tabla 1**. La capacidad de varias especies de levaduras para utilizar n-alcenos y otros hidrocarburos alifáticos como única fuente de carbono y energía está mediada por la existencia de variadas formas microsómicas de citocromo P450. Estas enzimas fueron aisladas de especies como *Candida maltosa*, *Candida tropicalis* y *Candida apícola* (69).

Tabla 1. Enzimas relacionadas a la degradación de hidrocarburos de petróleo (71)

Enzymes	Substrates	Microorganisms	References
Soluble Methane Monooxygenases	C ₁ -C ₈ alkanes alkenes and cycloalkanes	<i>Methylococcus</i> <i>Methylosinus</i> <i>Methylocystis</i> <i>Methylomonas</i> <i>Methylocella</i>	McDonald et al. [46]
Particulate Methane Monooxygenases	C ₁ -C ₃ (halogenated) alkanes and cycloalkanes	<i>Methylobacter</i> <i>Methylococcus</i> <i>Methylocystis</i>	McDonald et al. [46]
AlkB related Alkane Hydroxylases	C ₅ -C ₁₆ alkanes, fatty acids, alkyl benzenes, cycloalkanes and so forth	<i>Pseudomonas</i> <i>Burkholderia</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Mycobacterium</i>	Jan et al. [47]
Eukaryotic P450	C ₁₀ -C ₁₆ alkanes, fatty acids	<i>Candida maltosa</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Iida et al. [48]
Bacterial P450 oxygenase system	C ₅ -C ₁₆ alkanes, cycloalkanes	<i>Acinetobacter</i> <i>Candobacter</i> <i>Mycobacterium</i>	Van Beilen et al. [49]
Dioxygenases	C ₁₀ -C ₃₀ alkanes	<i>Acinetobacter</i> sp.	Maeng et al. [50]



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Material Biológico

- Muestras de suelo
- Primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')

2.1.2 Equipos

- Autoclave Brinkman
- Balanza Analítica Ohaus Pioner
- Estufa de esterilización JP Selecta 2000210
- Microscopio Infinita Leo/LABCOME
- Incubadora JP Selecta 2000210
- Termociclador BioRad MyCycler™
- Agitador orbital de mesa digital Fortsul AO-3070
- Espectrofotómetro Pharma Spec UV-1700
- Baño de ultrasonido JP Selecta 3000683
- Extractor Soxhlet semi-automático VELP scientifica SER 148
- Baño María GEMMYCO YCW-010E
- pHmetro digital MIK-PH 100

2.1.3 Instrumentos de Laboratorio

- Asa de Digralsky
- Asas bacteriológicas
- Mecheros Bunsen
- Agitador Magnético
- Cámara de Neubauer BOECO-BOE01
- Pinzas de metal de laboratorio

- Bandejas de metal

2.1.4 Material de Vidrio

- Placas portaobjetos
- Frascos de vidrio tapa azul de 500 mL
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm
- Placas Petri 100 x 15 mm
- Matraces 250 mL
- Probetas 500 mL
- Luna de reloj
- Vasos de vidrio para extractor soxhlet semiautomático

2.1.5 Reactivos Químicos

- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Q.P. (MERCK)
- KH_2PO_4 Q.P. (MERCK)
- $(NH_4)_2SO_4$ Q.P. (MERCK)
- NaCl Q.P. (MERCK)
- Tween 80 Q.P. (SIGMA)
- Tritón X100 Q.P. (SIGMA-ALDRICH)
- Diclorometano Q.P. (SIGMA-ALDRICH)
- Diésel comercial
- Glucosa Q.P.
- Alcohol 96°
- Hipoclorito de sodio
- Agar-agar
- Isopropanol
- Alcohol 75°
- Agua destilada estéril
- Platinum Blue PCR Supermix
- Fenol – cloroformo
- Kit QIAquick PCR Purification Kit

- Columnas QIAGEN

2.1.6 Otros Materiales

- Alcohol de 96° comercial
- Bolsas estériles de polietileno
- Guantes de nitrilo
- Contenedores de plástico
- Etiquetas de papel
- Pala de acero
- Papel aluminio
- Papel Craft
- Pipetas Pasteur descartables
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Puntas para micropipeta
- Micropipetas (10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L)
- Filtro de membrana para jeringa 0.22 μ L (Millipore)
- Parafilm
- Pipetas de vidrio (0.5 mL, 1mL, 10 mL)
- Propipeta
- Celdas de espectrofotómetro
- Software Sequencher v.4.1 (Gen Codes)
- Software Statgraphics Centurion XVIII

2.2 MÉTODOS

2.2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

La colecta de muestras se realizó en las instalaciones de un taller de mantenimiento mecánico de una empresa de buses bajo el protocolo ISO 10381-6:2009 (74), que contiene líneas directrices para la recogida, manipulación y almacenamiento de suelos destinados al estudio de procesos microbiológicos en laboratorios. El taller mecánico de vehículos de la empresa tiene 31 años de actividad (25 de junio de 1985) y es el lugar en el que se realiza el mantenimiento de los buses que prestan servicios de

transporte inter-provincial. Aproximadamente desde hace 20 años, dentro de las instalaciones se cuenta con un grifo que suministra combustible a los 37 buses, 25 cargueros y camionetas de oficina.

Para seleccionar los sitios de muestreo y definir el tipo de suelo presente en la zona, primero se ejecutó un recorrido de campo. Teniendo determinada el área de forma regular se realizó un muestreo del tipo selectivo, el cual consiste en escoger sitios para la toma de muestras en base a diferencias obvias o típicas a juicio de expertos. Previo a la colecta, el equipo de muestreo fue descontaminado, por lo que inicialmente se realizó un enjuague con agua purificada para eliminar tierra y polvo, luego, se lavó con una solución de jabón libre de fosfato y finalmente fue enjuagado con agua destilada. Al tratarse de un suelo de uso industrial, se colectaron 3 muestras de 500 g a 20 cm de profundidad y se congregaron como una sola muestra representativa de toda el área. Se utilizaron frascos de vidrio oscuro de boca ancha, con tapa y sello de teflón que sirvieron como recipientes para las muestras las cuales fueron debidamente rotuladas (75).

2.2.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras se procesaron de forma inmediata su llegada al laboratorio después del muestreo. Con ayuda de una pinza se retiraron los restos de vegetación, piedras y agregados mayores y se pasó el suelo por un tamiz de 2 mm para facilitar el intercambio gaseoso entre las partículas y mantener su naturaleza aeróbica. Se dispusieron de nuevo las muestras en los frascos de vidrio y fueron almacenados en refrigeración a 4 °C hasta el análisis de las mismas (75).

2.2.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL SUELO

Para la caracterización de la muestra de suelo, se realizó el análisis de pH, nitrógeno, materia orgánica, fósforo total, conductividad eléctrica, lubricantes y combustibles. Los ensayos fueron llevados a cabo en el Laboratorio SERVILAB de la Unidad de Producción de Bienes y Servicios perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales y Formales de la Universidad Nacional de San Agustín – Arequipa.

2.2.4 OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CONSORCIO NATIVO MIXTO

Se pesó 10 gramos de la muestra de suelo en una luna de reloj, se pre-incubó a una temperatura de 25 °C por 24 horas para que la flora microbiana nativa se adapte a las condiciones ambientales. Transcurrido el tiempo de adaptación, se dispuso 1 g de la muestra en un matraz Erlenmeyer con 90 mL de caldo tripteína de soya y se dejó incubar a 32°C por 18 horas (76). Se trasvasó 10 mL del inóculo inicial a otro matraz Erlenmeyer con 90 mL de caldo tripteína de soya y se dejó incubar a 25 °C, por 48 horas a agitación constante de 150 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó conteo en cámara de Neubauer para determinar la concentración de microorganismos (cel/mL) en el caldo que posteriormente sirvió como inóculo para la determinación de parámetros del consorcio nativo mixto en reactores (77).

A partir del inóculo se realizaron diluciones seriadas, tomando una alícuota de 1 ml con una pipeta de vidrio, depositándola en un tubo con 9 mL de solución salina estéril y mezclando vigorosamente por 5 minutos con agitación manual. De esta dilución (10^{-2}) se extrajo, con una nueva pipeta estéril, 1 mL de la mezcla y se depositó en un nuevo tubo que con 9 mL de solución salina estéril para obtener así una dilución 10^{-3} . Se repitió esta misma metodología para la obtención de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} , teniendo en cuenta agitar bien el tubo previo a la extracción de cada alícuota (78).

Con ayuda de un rastrillo de vidrio estéril, las diluciones fueron sembradas independientemente por diseminación en superficie de placas Petri provistas con Agar Nutritivo como medio sólido para crecimiento general de microorganismos.

2.2.5 OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN MEDIO ENRIQUECIDO

Para la obtención y aislamiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos, se pesó 10 gramos de muestra de suelo y se colocó en un matraz Erlenmeyer al que se le añadió 100 mL de Medio Mineral Líquido (MML) suplementado con glucosa al 0.2 % (m/V) (79). Se dejó el cultivo en agitación a 150 rpm, durante 18 horas a 32 °C. Se trasvasó 10 mL del cultivo inicial a un matraz Erlenmeyer con 90 mL de MML suplementado con glucosa; del mismo modo, con ayuda de una pipeta estéril, se extrajo una alícuota de 10 mL del inóculo inicial y se vertió en un matraz Erlenmeyer con 90

mL de MML suplementado con glucosa al 0.2 %, Tritón X-100 a una concentración de 150 mg/L y diésel al 1% (V/V), denominando a este último medio de cultivo líquido como MMDG (77), a los que se dejó incubar por 5 días. El diésel utilizado en este estudio fue diésel comercial; este contiene 75.25 % de hidrocarburos alifáticos, con cadenas de carbono que están entre C11 a C24 y 24.7% de hidrocarburos aromáticos (80).

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron diluciones seriadas en tubos de vidrio, tanto del cultivo en MML suplementado con glucosa como del de MMDG, usando la misma metodología de la obtención del consorcio de microorganismos y seguidamente se extrajo una alícuota de 0.1 mL de cada dilución, las que fueron sembradas por superficie en placas provistas de medios sólidos preparados a partir de los medios líquidos MML + Glucosa y MMDG añadiendo agar al 1.5 %, denominándolos medios sólidos AMG y AMDG, respectivamente. Los medios sólidos fueron dejados en la incubadora durante 7 días a temperatura ambiente. En el **Anexo 7.1** se detalla la composición de los diferentes medios de cultivo utilizados.

Transcurrido el tiempo de incubación se hicieron repiques de las colonias, seleccionadas por su morfología y resembradas por separado en placas provistas de medio sólido. Se procedió a hacer repiques por el método de siembra de estría por agotamiento en medio sólido a partir de las placas madre hasta conseguir cultivos puros.

2.2.6 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE MICROORGANISMOS FUNCIONALES DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS

A partir de los repiques de las cepas aisladas se procedió a hacer la identificación macroscópica reportando la forma, borde, apariencia y pigmentación de las colonias a simple vista en la placa. La caracterización microscópica se llevó a cabo haciendo una coloración por el método de Gram para determinar la morfología de las cepas obtenidas vistas al microscopio (81).

2.2.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

2.2.7.1 AISLAMIENTO DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN ARNr 16S PARA BACTERIAS

Las placas con cultivos puros de las bacterias fueron enviadas al Instituto de Biotecnología del ADN Uchumayo, en donde el ADN de las cepas nativas fue aislado de la siguiente manera: se tomó una asada de colonias de la placa Petri, la cual fue resuspendida en 600 uL de buffer de lisis 1X en un tubo Eppendorf, luego se incubó en hot block por 45 minutos a 65 °C, después de este periodo se agregó 300 uL de Fenol-Cloroformo y 100 uL de microperlas de 500 um, se agitó en vórtex a 1500 rpm por 3 minutos y se llevó a centrifugación por 10 minutos a 15000 rpm. Se recolectó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf al cual se la añadió 500 uL de isopropanol, se llevó a centrifugación por 10 minutos a máxima velocidad, después se eliminó el sobrenadante y se conservó el pellet. El pellet se volvió a lavar con 600 uL de etanol al 75%, se llevó a centrifugación por 2 minutos y se descartó el sobrenadante; finalmente, el pellet que contenía el ADN se hizo secar a temperatura ambiente y luego fue resuspendido con 100 uL de agua destilada estéril.

Posteriormente, la amplificación del gen ARNr 16S se realizó mediante la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para realizar la PCR, a cada tubo de PCR se añadió 2 µL de ADN de cada muestra, 2 µL de la solución de primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') y 30 µL de Platinum Blue PCR Supermix. Los tubos se colocaron en un termociclador BioRad y las condiciones de amplificación se programaron de la siguiente manera: 95 °C por 5 minutos, 25 ciclos de 94 °C por 70 segundos (desnaturalización), 55 °C por 70 segundos (hibridación) y 72 °C por 90 segundos (extensión). Finalmente 1 ciclo a 72 °C por 7 minutos. Luego de la amplificación, las muestras fueron mantenidas en el termociclador a 4°C (post incubación).

El producto de la PCR fue separado en un gel de agarosa al 1.5% y la banda correspondiente al gen RNAr 16S (1444 pb) fue cortado del gel para su purificación utilizando el kit *QIAquick PCR purification*, donde se utilizaron columnas de QIAGEN y se siguieron las instrucciones de la compañía.

2.2.7.2 SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

A 20 uL de ADN purificado se le añadió 1 uL de primer para secuenciar el gen ARNr 16S para bacterias. Los tubos fueron etiquetados y enviados a Functional Biosciences, Inc. (USA), en donde fueron secuenciados siguiendo el método Sanger acoplado a Big Dye terminator v3.1 y corridos en un secuenciador ABI 3770xl. Las secuencias fueron chequeadas y corregidas usando el software Sequencher v. 4.1 (Gene Codes).

2.2.7.3 FILOGENIA MOLECULAR

Las secuencias del gen RNAr 16S de las cepas nativas que fueron obtenidas por secuenciación, fueron analizadas individualmente y comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank utilizando el programa bioinformático de alineamiento de secuencias de tipo local BLAST, en el cual se comparó la secuencia problema con otras secuencias depositadas en la base de datos (82); luego se construyeron árboles filogenéticos para determinar las distancias genéticas y porcentaje de similitud con otras especies.

2.2.8 PRE-CULTIVO DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS

Una asada de cada una de las cepas aisladas, fue pre-cultivada inicialmente en 100 mL de Caldo Cerebro Corazón, un medio de uso general adecuado para el cultivo de una amplia variedad de bacterias, levaduras y hongos filamentosos (82), en matraces Erlenmeyers de 250 mL con agitación a 120 rpm durante 24 horas. Al día siguiente, la pureza de los pre-cultivos fue verificada al microscopio y se tomó inóculos de concentración conocida, determinada por conteo en cámara de Neubauer, para depositarlos en reactores con medio líquido enriquecido.

2.2.9 ESTABLECIMIENTO DE LOS SISTEMAS REACTORES

Se dispusieron 6 frascos de vidrio transparentes de 500 mL provistos con 500 mL de medio MMDG que sirvió como emulsificante, esto con la finalidad de realizar los ensayos la determinación de la curva de crecimiento microbiano, degradación de hidrocarburos, concentración de glucosa y variación de pH en el tiempo. Todos los frascos provistos de medio mineral y suplementados con glucosa fueron esterilizados en autoclave a 120°C y 1 atm de presión por 20 minutos. El diésel y el Tritón X-100

fueron añadidos después de la esterilización haciendo uso de jeringas y filtros de membrana para cada sistema.

Se procedió a inocular 1 mL del pre-cultivo a una concentración conocida de cada cepa bacteriana (3×10^8 cel/mL) en 5 frascos provistos de MMDG y 1 frasco adicional con MMDG sin inóculo que sirvió como testigo. Se dejaron los frascos a temperatura ambiente y en agitación a 150 rpm por 13 días, durante los cuales se fueron realizando ensayos para la determinación de la capacidad degradante de cada una de las cepas.

2.2.10 ENSAYOS DE PARÁMETROS DE ACTIVIDAD BIODEGRADATIVA

Todas las muestras fueron sonicadas antes de ser ensayadas con el fin de neutralizar la actividad degradante de los microorganismos durante el tiempo de ejecución de los experimentos de laboratorio.

2.2.10.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MICROORGANISMOS POR CONTEO EN CÁMARA DE NEUBAUER

Se tomó 3 mL de muestra del sistema reactor correspondiente al día de ensayo con ayuda de una jeringa y se depositaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL por duplicado, previamente esterilizados. Se conservaron los tubos en refrigeración a 4 °C para detener el crecimiento microbiano. Se realizó el recuento de microorganismos en cámara de Neubauer por día de cada cepa y se construyeron las curvas de crecimiento correspondientes en el tiempo.

2.2.10.2 DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS POR MÉTODO GRAVIMÉTRICO

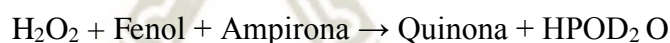
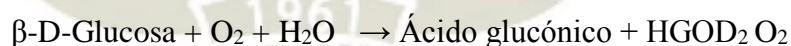
Se efectuó la determinación de hidrocarburos según el método gravimétrico EPA 3540C (1996a) utilizando diclorometano como extractante. Se tomó el frasco correspondiente al día de ensayo indicado y se extrajo 50 mL de muestra para ser depositada en una pera de decantación, se añadió 30 mL de diclorometano, se agitó vigorosamente por 5 minutos y se dejó reposar la pera en el soporte universal hasta visualizar la separación de los líquidos inmiscibles entre sí. Luego, se retiró la fase orgánica y se realizó un segundo lavado con diclorometano de la fase acuosa. Una vez obtenida toda la fase orgánica, fue llevada al vaso (previamente pesado) del extractor

soxhlet semi-automático que fue programado para realizar la recuperación del diclorometano, quedando como residuo el diésel en el vaso.

2.2.10.3 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA POR MÉTODO GLUCOSA PAP-SL/ESPECTROFOTÓMETRO

Con ayuda de una micropipeta, se extrajo 3 uL de muestra del reactor seleccionado por día de ensayo para cada cepa, se depositó cuidadosamente en el fondo de un tubo de vidrio, luego se le agregó 300 uL del reactivo Glucose PAP-SL, fundamentado mediante la reacción Trinder, y se dejó calentar en baño María a 37°C por 5 min. Transcurrido el tiempo, se diluyó en 700 uL de agua estéril y, con un poco de esta disolución, se hizo un pequeño lavado de la cubeta del espectrofotómetro para evitar la lectura de interferentes. Seguidamente se llenó la cubeta y se procedió a hacer la medición correspondiente a 500 nm en el espectrofotómetro (84). Previamente, se hizo la lectura de un blanco en tubo sin muestra. El ensayo se efectuó por triplicado por cada muestra correspondiente al tiempo de ensayo de cada cepa o consorcio.

El fundamento Trinder consiste en que la glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.



2.2.10.4 DETERMINACIÓN DE pH

Se extrajo 30 mL de muestra de los reactores diariamente y se tomó referencia del pH. Se utilizó un pHmetro digital, enjuagando el electrodo con agua destilada antes y después de introducirla en la muestra correspondiente al día de ensayo para mantener el instrumento calibrado (85).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DEL SUELO

En el área de distribución de combustible se evidenció la presencia de suelo potencialmente contaminado con combustible diésel, observándose manchas separadas diferenciadas de la totalidad del área, de color oscuro y olor característico. Se tomaron muestras de los sitios potencialmente contaminados para determinar sus características generales y así poder tener noción de la viabilidad del proceso de degradación bacteriana. Los resultados de los ensayos fisicoquímicos realizados a la muestra de suelo se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características fisicoquímica de suelo potencialmente contaminado

Determinación	Unidad	Método de Ensayo	Resultado
Textura	-	UNE 77314:2001	Franco-arcilloso-arenoso
pH	-	Método pH Métrico	7.25
Nitrógeno	%	Método 2.057 de la AOAC.	0.66
Materia Orgánica	%	Método Walkley Black	0.77
Fósforo Total	ppm	Método Colorimétrico de la AWWA	38.21
Lubricantes y Combustibles	ppm	Método de Extracción por Solventes	68597.84
Conductividad Eléctrica	mS/cm	Método Potenciométrico	5.23

Textura: Según la clasificación granulométrica, la clase textural de la muestra de suelo es franco-arcillosa, estas clases de suelos presentan ciertas capacidades físicas correspondientes a este tipo de textura fina, tales como: permeabilidad media, superficie específica media y capacidad de retención de agua media (86).

En la investigación realizada por García, M. et al (2012) (87), se estudió la biodegradación de un crudo mediano en suelos del estado de Anzoátegui (Venezuela) encontrándose diferentes texturas: arenosa constituida por cuarzo e ilita y franco-

arcilloso-arenoso conformado por cuarzo y caolinita; determinando la concentración de hidrocarburos totales de petróleo durante 90 días mediante el método de extracción sohxlet y el de cromatografía de absorción en columna. Se encontró que la textura franco-arcillosa-arenosa favoreció el proceso de biodegradación de los hidrocarburos totales, especialmente de los compuestos saturados, por lo que este factor debe ser considerado para restaurar este tipo de suelos contaminados con hidrocarburos. Las mejores condiciones físicas de los suelos arcillo-arenosos (mayor capacidad de retención de humedad, entre otras) posiblemente favorecen la biodegradación con respecto a suelos que presentan textura arenosa (87).

En un trabajo previo, Andreas et al. (2010) (88) indican que la disponibilidad y el contacto microorganismo-hidrocarburo es fundamental en un proceso de biorremediación; por tal motivo, la textura franca y sus variantes pueden servir mejor en el caso de usar esta técnica para la recuperación de suelos (88).

pH: Los suelos más adecuados para cultivos son los que tienen un pH comprendido entre 5.8 y 7.5 ya que los nutrientes en general presentan su máxima solubilidad en este intervalo (86). La muestra de suelo analizada en este trabajo presentó un pH de 7.25, por lo que se afirma que presenta un pH de carácter neutro (6.5 a 7.8); esto coincide con las características de los terrenos aledaños al sitio de muestreo, los cuales utilizados en su mayoría para el cultivo de tubérculos y hortalizas de la región.

El resultado de la determinación de pH también es contrastable con el trabajo de Santos Jallath (89), en el cual se realiza la caracterización de suelo de una estación de descarga de diésel de la empresa minera La Encantada, en donde se ubican tanques de almacenamiento de combustible para cargar diésel en camiones, pipas, cargadores y otros equipos. El pH reportado de los puntos de muestreo elegidos a juicio de expertos, se encuentran en el rango de 7.4 a 7.7 (89), tratándose también de un suelo con carácter neutro, lo cual lo hace favorable en procesos de biodegradación (89).

Hernández-Acosta (2016) (90) realizó la caracterización de un suelo contaminado con hidrocarburos en Minatitlán, Veracruz. Los resultados indican que el pH ácido (< 4.5) es un factor limitante para los procesos de biodegradación (90), ya que el valor más óptimo debe encontrarse en rangos de 6 a 8 o ser o más cercano al carácter neutro (91).

Hajira Tahir y Zehra Mushtaque colectaron muestras de la playa Clifton de Karachi (Pakistan) en donde se produjo un derrame de aceite conocido como el desastre de Tasman Spirit, analizando las propiedades físicas de las mismas. Los valores de pH de todas las muestras variaron de 7.6 – 8.3, mostrando condiciones neutrales y básicas (92).

Adebiyi y Adeyemi (2), analizaron los parámetros fisicoquímicos de suelos impactados por hidrocarburos alrededor de un depósito de productos de petróleo refinado en Nigeria, en donde se registraron valores de pH entre 6.18 y 7.51 con un valor promedio de 6.57, mientras que los valores de las muestras control se encuentran entre 5.85 y 6.21 con un promedio de 6.03. Bajo estos resultados se demostró que el valor de pH de las muestras de suelo impactado es más alto que las del suelo control aunque, según la lógica estadística, esta diferencia no fue significativa, concluyendo que el suelo impactado sigue teniendo un carácter cercano al neutro. También se encontró que los niveles de CO_3^{-2} en los suelos contaminados es de 1.21%, mientras que los suelos control presentan un 0.75 % de estas sales; por lo tanto, se infiere que la unión del aceite con las partículas de suelo impactado debió haber limitado la lixiviación de los iones básicos responsables de elevar el pH del suelo, produciéndose su acumulación y presentando concentraciones más altas que en el suelo control (2).

En el trabajo de Martínez y López (2001) (27), se analizaron suelos contaminados con diésel, gasolina y combustóleo y se pudo determinar que la presencia de estos contaminantes presentan diferentes efectos sobre los valores de los parámetros. Se afirma que el pH prácticamente no varía con la presencia de cualquier concentración y tipo de hidrocarburo, por lo que se conserva ligeramente ácido. El análisis de varianza entre el parámetro pH, contra los factores concentración y tipo de hidrocarburo, determinó que no hay diferencia significativa ($P < 0.05$), es decir, el suelo, sometido a contaminación a dosis de 100 a 150 000 mg kg⁻¹ de gasolina, diésel o combustóleo, produce efectos sobre el pH, los cuales son mínimos de tal manera que no se percibe efecto en esta variable. Como la variación oscila con valores menores que 1, no repercutiría en caso de usarse este dato en alguna tecnología de limpieza como la biorremediación la cual requiere un rango de pH de 6 a 8 (27).

Nitrógeno: Se registró la concentración de nitrógeno total en las muestras de suelo analizadas, obteniéndose un 0.66 %, lo que representa niveles relativamente muy altos. Se conoce que el nitrógeno se encuentra disponible en la naturaleza de forma orgánica e inorgánica. El nitrógeno orgánico está presente en las proteínas, aminoácidos y ácidos húmicos del suelo el cual no es asimilable por las plantas. Las fracciones de nitrógeno inorgánico son nitritos ($N-NO_2$), nitratos ($N-NO_3$) y amonio ($N-NH_4$), siendo las dos últimas fracciones las asimilables por las plantas, por ello es importante su determinación de para fines de estudios de la evolución del suelo (86).

De acuerdo a Ellis y Adams (1960) (93), encontraron grandes incrementos en cuanto al nitrógeno presentes en suelos contaminados con gas natural o crudo comparado con suelos normales (93). Del mismo modo, suceden cambios en las condiciones de fertilidad de suelos a los que se les evaluó las propiedades físicas y químicas, observándose incrementos en nitrógeno y contenido de materia orgánica (94).

Materia Orgánica (COT): La materia orgánica determinada por el método de Walkley-Black, consiste en una oxidación con dicromato de potasio diluido en un medio fuertemente ácido, donde el dicromato se consume para oxidar la materia orgánica, la parte que no reacciona se cuantifica con sulfato ferroso amoniacal valorado (95). En este caso, el contenido de materia orgánica del suelo contaminado es la suma de materia biogénica (por la descomposición de vegetales y animales) y materia petrogénica (por hidrocarburos). Es uno de los parámetros con variaciones importantes, la cual aumenta en forma proporcional a la concentración de hidrocarburos gasolina y combustóleo. Puede apreciarse, que el diésel es el hidrocarburo que causa un mayor aumento, disparándose a partir de concentraciones de $30\ 000\ mg\ kg^{-1}$ obteniéndose hasta 347% de incremento, comparado con el suelo sin hidrocarburos. En el caso del diésel (cuyos compuestos tienen una estructura C 10 a C 23) y con mínimo contenido de compuestos volátiles se oxida en su mayor parte, reflejándose en valores altos de materia orgánica.

Fósforo total: El suelo presenta niveles altos de fósforo asimilable por las plantas (86). La biodisponibilidad del fósforo depende de varios factores, siendo el principal de ellos el pH del suelo. Los suelos básicos (calizos), presentan formaciones de fosfatos insolubles a través de procesos de insolubilización, mientras que en suelos ácidos, los

procesos de mineralización y solubilización se ven favorecidos, incrementando la cantidad de fósforo susceptible de asimilación por las plantas (96) .

Lubricantes y combustibles: Los resultados de la caracterización fisicoquímica del suelo se orientaron básicamente a los valores de los parámetros que determinan la calidad del suelo (86); siendo el parámetro de mayor interés la concentración de hidrocarburos derivados de petróleo. Los estándares que se utilizaron como comparación corresponden a los Estándares de Calidad Ambiental de Suelo, reglamentado por el Ministerio del Ambiente peruano. Dichos estándares indican que la medida máxima de los niveles de concentración de hidrocarburos de petróleo (Fracción media de hidrocarburos (>C10-C28) para el uso de suelos de tipo comercial/industrial/extractivo no deben exceder los 5000 mg/kg. Las muestras de suelo analizadas presentan una concentración promedio de 68597.84 mg/kg, por lo que rebasan cualquier límite permisible, no cumpliendo con las normas legales vigentes (97).

Se asume que TPH es equivalente a aceites y grasas porque la contribución de lípidos carbohidratos y otros compuestos orgánicos de origen no petrolero es despreciable, (mucho menos del 0.01 %) en este tipo de muestras (98).

En el estudio de Ujowundu et al. (2011) (99), la cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) e hidrocarburos poliaromáticos (HPA) fue de 46726.80 mg/kg y 844.40 mg/kg respectivamente en el suelo contaminado y 2.90 mg/kg y <0.001 mg/kg para suelo no contaminado. Las altas concentraciones de HTP y los HPA son debido a la contaminación por diésel (99).

Santosjallath (89), determinó concentraciones de diésel de un punto de muestreo de la empresa minera La Encantada que posee una estación de descarga de diésel en la que se ubican tanques de almacenamiento de combustibles para cargar diésel en camiones, pipas, cargadores y otros equipos. La operación se realiza mediante una tubería que está suspendida para suministrar el combustible por la parte superior de los equipos. Es así que también se observan manchas de diésel en el suelo, pendiente abajo del punto de carga (89). Este sitio donde los camiones cargan el diésel presenta una elevada concentración de hidrocarburos (16 495 mg/kg a la profundidad de 0 – 30 cm)

lo que sería debido a los escurrimientos accidentales de diésel durante la operación de carga. De 0.30 a 0.80 cm los hidrocarburos disminuyen a 12 423 mg/kg y de 0.80 a 1.20 la concentración es muy inferior al nivel de referencia (89).

Existe también una caseta de descarga del diésel ubicada en el área del taller de mantenimiento mecánico donde un proveedor descarga el diésel en este sitio, el cual escurre por gravedad hacia los tanques de almacenamiento. En los espacios contiguos a esta caseta también se observa en el suelo una franja de diésel producto de los derrames ocasionados durante la descarga. En el punto en la entrada de la caseta donde se descarga el diésel que abastece el proveedor, es evidente una mancha de combustible en el suelo cuyo diámetro es aproximadamente de 2 m y la concentración encontrada es de 42 309 mg/kg (89) .

3.2 OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CONSORCIO NATIVO MIXTO

En el desarrollo de los procesos de biorremediación se produce la participación de diferentes especies de microorganismos activos (bacterias, levaduras y hongos) que son capaces de degradar diferentes compuestos. El consorcio microbiano nativo presente en el suelo está determinado por la cuantificación de la microbiota aeróbica nativa que se ha desarrollado bajo condiciones aeróbicas a una temperatura de 25 – 30 °C. Esta carga depende generalmente de la fuente de nutrientes el medio en el que se desarrollan y es la que la biodiversidad puede variar en cantidad. Cuando el suelo está contaminado, aumenta la población microbiana total, pero se restringe el número de especies pues favorece en gran medida el desarrollo de microorganismos con capacidad de degradar el contaminante en compuestos más simples (100).

La cuantificación de las poblaciones, permiten tener una idea del proceso de transformación y la relación entre los diferentes grupos fisiológicos activos. Los medios nutritivos sólidos permiten también explorar las diferencias morfológicas de la población nativa mixta en comparación con poblaciones más específicas (100).

La concentración de microorganismos aeróbicos totales conformado por el consorcio nativo mixto del suelo contaminado, fue determinado por cultivo en medio líquido caldo triptona de soya y conteo en cámara de Neubauer, registrando un valor de 3×10^8

cel/ml, mientras que la muestra control presentó 5.2×10^8 cel/mL, evidenciando una concentración microbiana menor que la del suelo control. La pérdida de población microbiana en las muestras de suelo contaminado pudo ser debido a las altas concentraciones de diésel a las que son expuestos, siendo altamente tóxico para las membranas celulares de microorganismos no tolerantes.

En la **Figura 4**, se muestra el crecimiento en placa para cada dilución del consorcio nativo mixto del suelo contaminado. Para que el recuento sea estadísticamente significativo se seleccionó la placa de la dilución que presentó un número de colonias comprendido entre 30 y 300 colonias, reportando un recuento expresado en unidades formadoras de colonias de 3.8×10^7 UFC/g en la placa de la dilución 10^{-3} , comprobando la variación cuantitativa microbiana de medio líquido a medio sólido. Esta siembra en placa fue realizada con el fin de determinar el recuento de microorganismos viables, principalmente fundamentado en la capacidad que tienen dichas células de desarrollar una colonia visible en un medio apropiado (101).

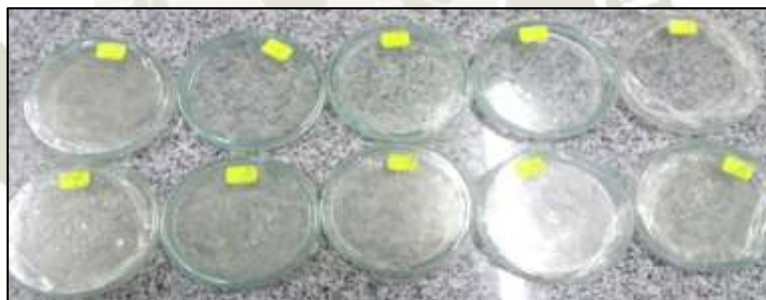


Figura 4. Diluciones seriadas de consorcio nativo mixto en medio AMDG

La menor población de microorganismos encontrados en el suelo contaminado con diésel, en comparación con el consorcio mixto, podría ser el resultado del deterioro del intercambio gaseoso y la retención de dióxido de carbono en el suelo, pues éste está siendo constantemente afectado por nuevos derrames del conjunto de hidrocarburos contaminantes, los cuales podrían haber producido pérdida de biodiversidad en cuanto a especies microbianas. En contraste con esto, existen estudios en los que se determina la cantidad de microorganismos aeróbicos presentes en suelo contaminados con hidrocarburos. Es el caso del trabajo realizado por Criste et al. (2016), en el que se obtiene una carga de 57×10^4 UFC/g en muestras de suelo contaminado, mientras en un suelo control (sin contaminante) se determinó la cantidad de 51×10^4 UFC/g de

suelo. Estos resultados mostraron que existe una variabilidad fisiológica en cuanto al tipo de microorganismos presentes en cada suelo y la carga microbiana debido a las características de la fuente de origen (100). En este caso, la menor cantidad de microorganismos presentes en el suelo control, pudo ser debido a que el suelo contaminado era un área reconocida por contaminación masiva de petróleo, existiendo una comunidad microbiana en constante adaptación y bioaumentación en el tiempo, que no sufría alteraciones ni estaba expuesta a nuevos derrames que inhibieran su desarrollo.

Lang et al. (2016) (80), estudiaron la microflora total de sedimentos de manglares del río Wouri en Camerún usando medio líquido enriquecido con glucosa, peptona y extracto de levadura, obteniendo 1×10^8 UFC/g de suelo. Luego, experimentaron recuentos de microorganismos en medio mineral que contenía 10 ppm de diésel como única fuente de carbono, obteniendo un recuento de flora competente de 1.5×10^7 UFC/g de suelo (80).

La microflora total y la fracción de microflora funcional degradante de hidrocarburos pueden variar y depender de las condiciones climáticas del ambiente, el grado de contaminación y las características del lugar de muestreo.

Ujowundu (99) determinó el crecimiento de microorganismos de suelos contaminados y no contaminados por el método de diluciones seriadas y siembra en placas provistas medio nutritivo para la enumeración de bacterias aeróbicas heterótrofas, presentando una tasa de crecimiento bacteriano de 1.3×10^9 UFC/g y 4.6×10^9 de UFC/g de suelo contaminado con diésel y suelo no contaminado, respectivamente (99).

3.3 OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN PRESENCIA EN MEDIO ENRIQUECIDO

A partir del crecimiento en placa de las diluciones sembradas en los medios MML + glucosa (**Figura 5**) y AMDG (**Figura 6**), se determinó cuantitativamente la población de microorganismos viables por siembra en placa, reportando concentraciones poblacionales de 1.15×10^7 y 2.74×10^7 UFC/g, respectivamente.



Figura 5. Población microbiana desarrollada en medio AMG

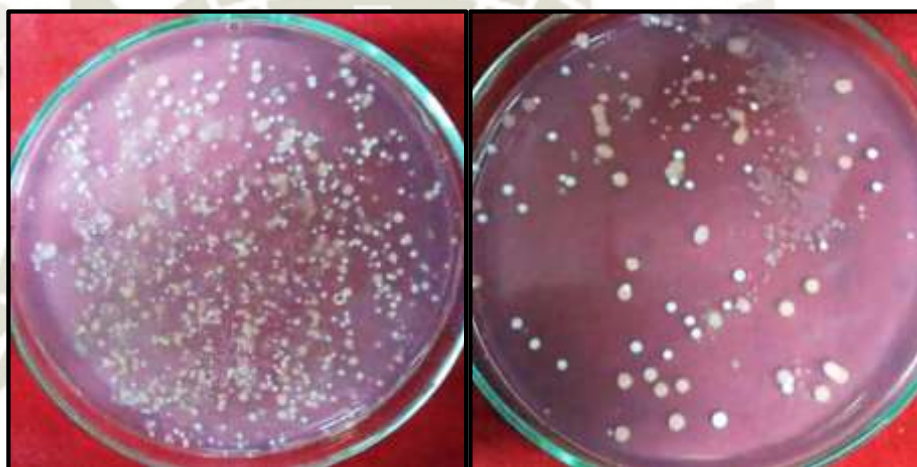


Figura 6. Población microbiana desarrollada en medio AMDG

Nápoles (2005) (102), realizó una caracterización de suelos contaminados con hidrocarburos en tres estaciones de una refinería impactada con hidrocarburos, cuantificando una concentración de población microbiana heterótrofa del orden 10^6 UFC/g de suelo para hongos y bacterias (102).

Es importante que exista una población microbiana suficiente, activa y con la capacidad de asimilar distintos sustratos hidrocarbonados para poder elegir y aplicar las distintas técnicas de biorremediación como por ejemplo la bioaumentación, la cual es siempre es favorable cuando se introduce población microbiana nativa al sitio contaminado en lugar de población exógena.

Se han realizado estudios acerca del uso de tensoactivos (surfactantes) que mejoran las tasas de biodegradación de hidrocarburos, pues estos contaminantes presentan carácter

hidrofóbico y baja solubilidad en agua, produciendo una disminución notable de la velocidad de transferencia de masa, ya que la mayoría de fuentes de carbono no están completamente disponibles para los microorganismos en el medio (103). Las gotas del compuesto hidrofóbico, en este caso del hidrocarburo inmisible en agua, quedan atrapadas en las micelas del tensoactivo, siendo transferidas a la fase acuosa (104). En paralelo, se produce un mecanismo para aumentar la velocidad de transferencia de masa que implica cambios producidos por el tensoactivo en la superficie de las células microbianas, lo que produce una afinidad hacia los hidrocarburos. Como resultado, aumenta la adherencia microbiana hacia la fase oleosa, incrementándose también la absorción directa de compuestos hidrocarbonados por parte de los microorganismos degradadores (105).

El efecto de tensoactivos como Tritón X-100 interactúa directamente con la superficie de las células bacterianas dependiendo de los tipos de surfactante, microorganismos e hidrocarburos relacionados. Mohanty y Mokherji (106), demostraron que el Tritón mejora significativamente la velocidad y el grado de degradación del diésel por los microorganismos *E. aurantiacum* y *B. cepacia* (106).

Wyrwas et al. (107), utilizaron Triton X-100 como surfactante mediador de la biodegradación de combustible diésel como única fuente de carbono para un consorcio microbiano aislado de un sitio contaminado con crudo de petróleo, mostrando que el uso de hasta 600 mg/L de este surfactante disminuía la cantidad de biomasa (aproximadamente 20%) en comparación con el crecimiento en 150 mg/L el cual presentaba una inhibición mínima, mientras que el uso de concentraciones más altas representaba una mayor limitación para el crecimiento microbiano (900 mg/L) (107).

El método más aceptable para el aislamiento de organismos que son capaces de tolerar y/o degradar hidrocarburos es el uso de medio de enriquecimiento de sales minerales-hidrocarburo en el cual el hidrocarburo es la única fuente de carbono y energía utilizada para el crecimiento de microorganismos. Esta técnica ha sido utilizada en numerosos estudios de actividad biodegradativa tanto para consorcios como para aislados específicos (108). Un medio mínimo de sales es un medio que contiene la cantidad indispensable de nutrientes capaz de permitir el desarrollo de microorganismos no tan altamente exigentes, desde el punto de vista nutricional, pues

constan solo de una forma de carbono orgánico (como glucosa o hidrocarburos) y una serie de iones, como Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} y NH_4^+ , presentes como sales inorgánicas (109).

Para que una bacteria sea capaz de crecer en este tipo de medio con componentes mínimos, esta debe ser capaz de sintetizar todos los componentes orgánicos esenciales (p.e. aminoácidos, purinas, pirimidinas, azúcares, vitaminas y ácidos grasos), por lo que se le denomina potrótofa; sin embargo, cuando una bacteria pierde la capacidad de sintetizar componentes orgánicos se le llama auxótrofa. Al MML de este trabajo no se le añadieron micronutrientes esenciales, por lo que se explicaría la inhibición del desarrollo de microorganismos que sí están presentes en la comunidad mixta microbiana obtenida en el medio enriquecido tripteína de soya; sin embargo, sí surgieron dos tipos de especies bacterianas (CB y CR), las cuales fueron de gran interés por las inferencias sobre su capacidad biosintética (109).

La contaminación del suelo con hidrocarburos derivados de petróleo incrementa enormemente la población microbiana total, pero restringe considerablemente el número de especies, favoreciendo solo el desarrollo de los microorganismos que pueden degradar los contaminantes en compuestos más simples. Probablemente, la actividad y la relación de sinergia entre los distintos grupos funcionales presentes sean más importante que la cantidad total de microorganismos.

Se utilizó glucosa, una de las fuentes más típica de carbono para microorganismos, porque existen estudios en los que se analiza el orden de reconocimiento de los sustratos carbonados, encontrándose diversidad poblacional y selección de especies por adaptabilidad. En varios casos se dio la evolución inmediata del desarrollo microbiano a partir de la inoculación en testigos positivos (con glucosa) a comparación de testigos negativos (sin glucosa), deduciéndose que se utiliza otra maquinaria enzimática previa a la adaptación para llevar a cabo la degradación (79).

Es probable que la población que creció en MML suplementado con glucosa, siendo ésta la única fuente carbonada, sea tolerante a la presencia de hidrocarburos del suelo contaminado, pero que no posean la maquinaria enzimática para degradarlos, a diferencia de las comunidades que crecieron en MMDG en presencia de diésel que,

además de tolerarlo, se presumió que poseían capacidad para degradarlo. Consecuentemente, la densidad poblacional para los microorganismos tolerantes y a la vez degradadores se dio en mayor proporción.

También es posible de que exista competencia entre las poblaciones de la comunidad. Cuando una población se acumula y los recursos nutricionales comienzan a reducirse, las poblaciones pueden realizar alguna de las siguientes estrategias: repartir los recursos entre los individuos de la población hasta que estos se agoten; la segunda implica competir de manera directa por el recurso, de manera que los individuos más fuertes tendrán acceso al recurso limitante, asegurando su reproducción, mientras que los más débiles mueren sin dejar descendencia (110).

3.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE MICROORGANISMOS FUNCIONALES DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS

En la **Figura 7** y **Figura 8** se pueden observar las colonias de cultivos puros aislados en placas con medio AMDG. Se desarrollaron dos tipos de colonias bacterianas aparentemente diferenciadas por sus características fenotípicas, a las que se denominó CR y CB.



Figura 7. Colonias Rosadas (CR) aisladas en placa con medio AMDG

En la figura **Figura 9** se aprecia las características vistas al microscopio de las tinciones Gram de CR y CB. La tinción para CR dio como resultado la observación de cocos Gram positivos, mientras que en la tinción de CR se observaron bacilos gram negativos.

En la **Tabla 3** se presentan las características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas CR y CB. Se lograron aislar dos géneros bacterianos Gram positivos

(CR) y negativos (CB) y se asumió que poseen un patrón común de tolerancia y degradación de hidrocarburos (111). A partir de estos resultados se puede deducir que la comunidad involucrada en los procesos de degradación es específica y tiende a tolerar de manera intrínseca el ambiente contaminado con hidrocarburos derivados del diésel en el que se encuentran, debido a su exposición prolongada y a la capacidad de utilizar esta fuente de energía. El tiempo que tardó CR para tomar la pigmentación rosa fue entre las 76 a 92 horas, mientras que CR no presentó pigmentación.



Figura 8. Colonias Blancas (CB) aisladas en placa con medio AMDG

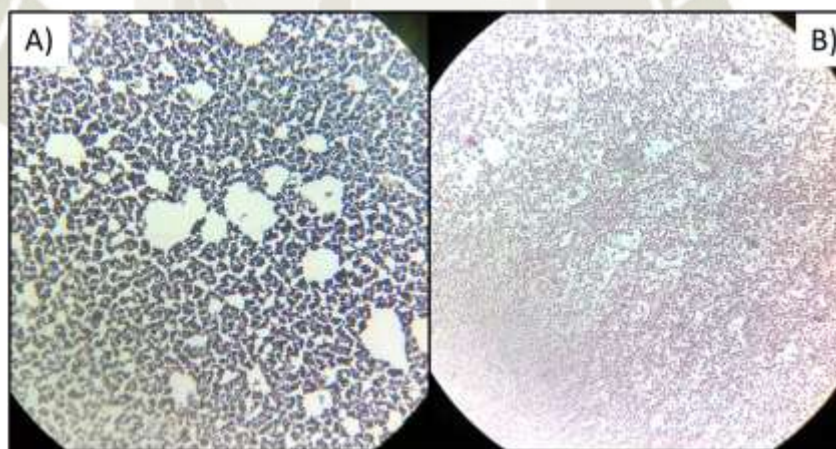


Figura 9. Microscopía a 40X de tinción Gram para CR y CB.
A) Cocos Gram positivos (CR). B) Bacilos Gram negativos (CB).

En la **Tabla 3** se presentan las características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas CR y CB. Se lograron aislar dos géneros bacterianos Gram positivos (CR) y negativos (CB) y se asumió que poseen un patrón común de tolerancia y degradación de hidrocarburos (111). A partir de estos resultados se puede deducir que la comunidad involucrada en los procesos de degradación es específica y tiende a tolerar de manera intrínseca el ambiente contaminado con hidrocarburos derivados del

diésel en el que se encuentran, debido a su exposición prolongada y a la capacidad de utilizar esta fuente de energía. El tiempo que tardó CR para tomar la pigmentación rosa fue entre las 76 a 92 horas, mientras que CR no presentó pigmentación.

Tabla 3. Características macroscópicas y microscópicas de colonias aisladas (CR) y (CB)

Microorganismo	Características Macroscópicas	Características Microscópicas
CR	Redonda, convexa, lisa, cremosa, de pigmentación rosa.	Cocos Gram positivos. Microscópicamente se observan formando tétradas, pero también pueden estar en pares.
CB	Redondas, convexas, lisas, cremosas, de pigmentación blanca.	Bacilos Gram negativos.

Otros trabajos reportan tinción Gram positivo para cepas con forma de cocos aisladas a partir de muestras de suelo y agua cercanos a bombas de llenado de gasolina y diésel en la estación de Kamalapur, río Buriganga y ciudad de Dhaka. Se determinaron 6 géneros bacterianos como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Klebsiella* y *Corynebacterium*, los cuales fueron estudiados individualmente para la determinación de su capacidad degradativa con respecto a la gasolina, diésel y kerosene (111).

En otras investigaciones también se mencionan microorganismos degradadores de hidrocarburos con forma de bacilo y con respuesta negativa a la tinción Gram. Estas bacterias fueron determinadas como *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia Cepacia* y *Pseudomona Fluorescens*, que también presentaron actividad degradadora de hidrocarburos. En general, los bacilos se clasifican dentro de los microorganismos aeróbicos o facultativos y productores de catalasa, pueden ser Gram positivos o Gram variables. En cuanto a sus características generales, los bacilos producen endosporas, las que son termoresistentes y también son capaces de resistir en ambientes perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos (5).

3.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Gracias a la fiabilidad y rapidez del que se caracterizan los métodos moleculares actuales, es posible identificar un mayor número de especies con la capacidad de degradar hidrocarburos, ya sean en forma de consorcio o cepas puras. Para la identificación microbiana, la secuenciación de la región 16S del ARNr es la herramienta más utilizada, ya que este marcador está presente en todas las bacterias y además tiene un buen tamaño para realizar el análisis.

En la **Figura 10** podemos apreciar el resumen del análisis de alineamiento múltiple en el programa BLAST para la secuencia de CR, mientras que en la **Figura 11** se muestran las coincidencias de los alineamientos de las secuencias nucleotídicas para CR.

Search Parameters	
Program	blastn
Word size	11
Expect value	10
Hitlist size	100
Match/Mismatch scores	2,-3
Gapcosts	5,2
Low Complexity Filter	Yes
Filter string	L;m;
Genetic Code	1
Template length	18
Window Size	40

Database	
Posted date	Jan 28, 2018 5:18 PM
Number of letters	28,602,801
Number of sequences	19,670
Entrez query	None

Karlin-Altschul statistics		
Lambda	0.633731	0.625
K	0.408146	0.41
H	0.912438	0.78

Results Statistics	
Length adjustment	28
Effective length of query	1331
Effective length of database	28052041
Effective search space	37337266571
Effective search space used	37337266571

Figura 10. Resumen de análisis de alineamiento múltiple en BLAST de la secuencia de CR.

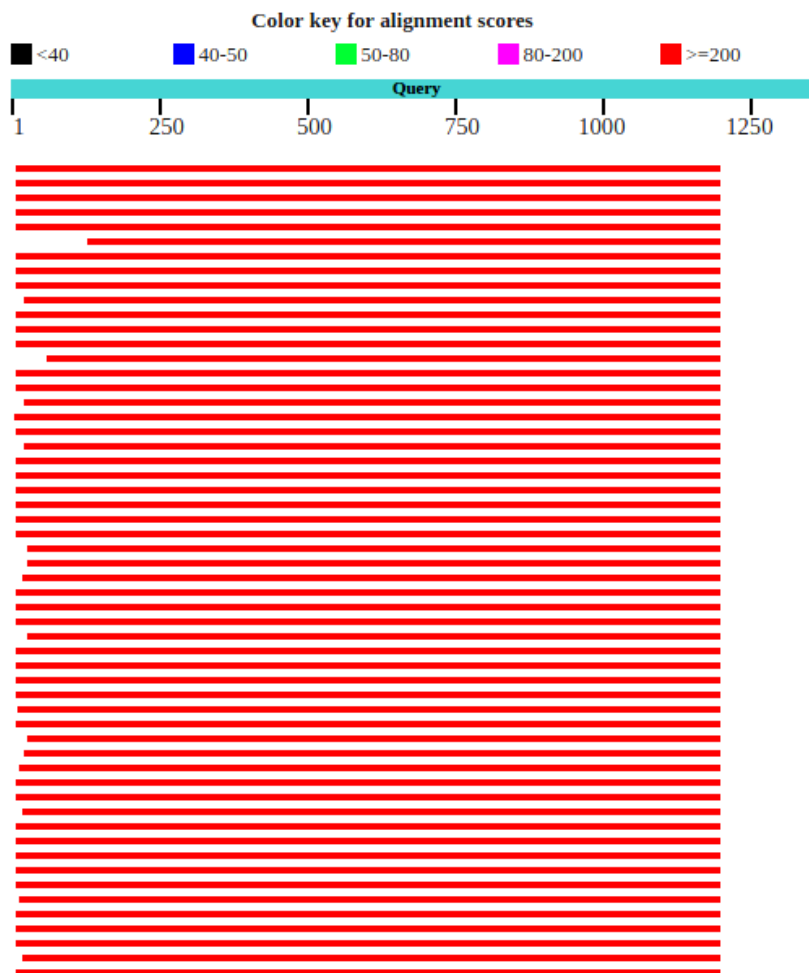


Figura 11. Resumen gráfico de los alineamientos de secuencias nucleotídicas para CR.

En la **Figura 12** se presentan las diferentes especies que al parecer son similares al modelo de la CR, teniendo en cuenta que al grupo de especies a la que pertenece es al de *Micrococcales*, un tipo de *Actinobacteria* que se puede encontrar en una diversidad de hábitats que incluyen suelos, rizósfera y sistemas marinos, la gran mayoría son capaces de descomponer una amplia gama de restos orgánicos e inorgánicos. Así mismo, en el laboratorio de biocatálisis y fermentación del centro de investigación para la biotecnología del Instituto de Ciencias de Indonesia, en el año 2016 se reportó un caso de bacterias capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos, pertenecientes a la especie de micrococcales, por lo que se cree que al tener estos antecedentes, las colonias CR corresponderían a esta taxonomía (112).

Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	Description
Micrococcales	102	92	
↳ Microsporangiaceae	20	64	
↳ Janibacter	10	9	
↳ Kriocella	5	5	
↳ Marhabibans asiaticum	1	1	Marhabibans asiaticum hits
↳ Monashia flava	1	1	Monashia flava hits
↳ Oryzobacter terrae	1	1	Oryzobacter terrae hits
↳ Tetraobaera	9	8	
↳ Microsporangium	9	6	
↳ Terrabacter	10	9	
↳ Terracoccus luteus	1	1	Terracoccus luteus hits
↳ Kribbia desulfurans	1	1	Kribbia desulfurans hits
↳ Lapilloccoccus jejuensis	1	1	Lapilloccoccus jejuensis hits
↳ Ornithinibacter aureus	1	1	Ornithinibacter aureus hits
↳ Humbacillus xanthopallidus	1	1	Humbacillus xanthopallidus hits
↳ Phycococcus	10	10	
↳ Oryzibutius	2	2	
↳ Fodinibacter luteus	1	1	Fodinibacter luteus hits
↳ Ornithinococcus	2	2	
↳ Ornithinimicrobium murale	1	1	Ornithinimicrobium murale hits
↳ Arsenicococcus	3	3	
↳ Dermatophilaceae	8	7	
↳ Mobilicoccus pelagius NBRC 104925	1	1	Mobilicoccus pelagius NBRC 104925 hits
↳ Kinetosphaera	2	2	
↳ Austwickia	2	2	
↳ Psicrococcus intestinalis NBRC 104926	1	1	Psicrococcus intestinalis NBRC 104926 hits
↳ Dermatophilus congolensis	1	1	Dermatophilus congolensis hits
↳ Dermacoccaceae	9	8	
↳ Dermacoccus	4	4	
↳ Yimella radialis	1	1	Yimella radialis hits
↳ Kytococcus	2	2	
↳ Calidifontibacter indicus	1	1	Calidifontibacter indicus hits
↳ Curtobacterium	6	4	
↳ Curtobacterium oceanosedimentum	2	1	Curtobacterium oceanosedimentum hits
↳ Curtobacterium citreum	2	1	Curtobacterium citreum hits
↳ Curtobacterium flaccumfaciens	1	1	Curtobacterium flaccumfaciens hits
↳ Curtobacterium luteum	1	1	Curtobacterium luteum hits
↳ Cellulomonadaceae	9	6	
↳ Oerskovia	5	5	
↳ Sedimentibacter luteus	1	1	Sedimentibacter luteus hits
↳ Pyrenicromonosporaceae	2	2	
↳ Luteimicrobium album	1	1	Luteimicrobium album hits

Figura 12. Análisis taxonómico de los alineamientos de mayor puntuación para CR.

Es así que en la **Figura 13** podemos observar el filograma de las especies que parecen estar relacionadas a la cepa CR, por lo que al no encontrar una semejanza del 100% con las reportadas en la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information) podría presumirse que se tratase de una nueva especie; sin embargo, debido a que en los ensayos previos a la secuenciación pudieron existir algunos contaminantes en la muestra, sería necesario incluir otras pruebas más específicas y con ello descartar cualquier error.

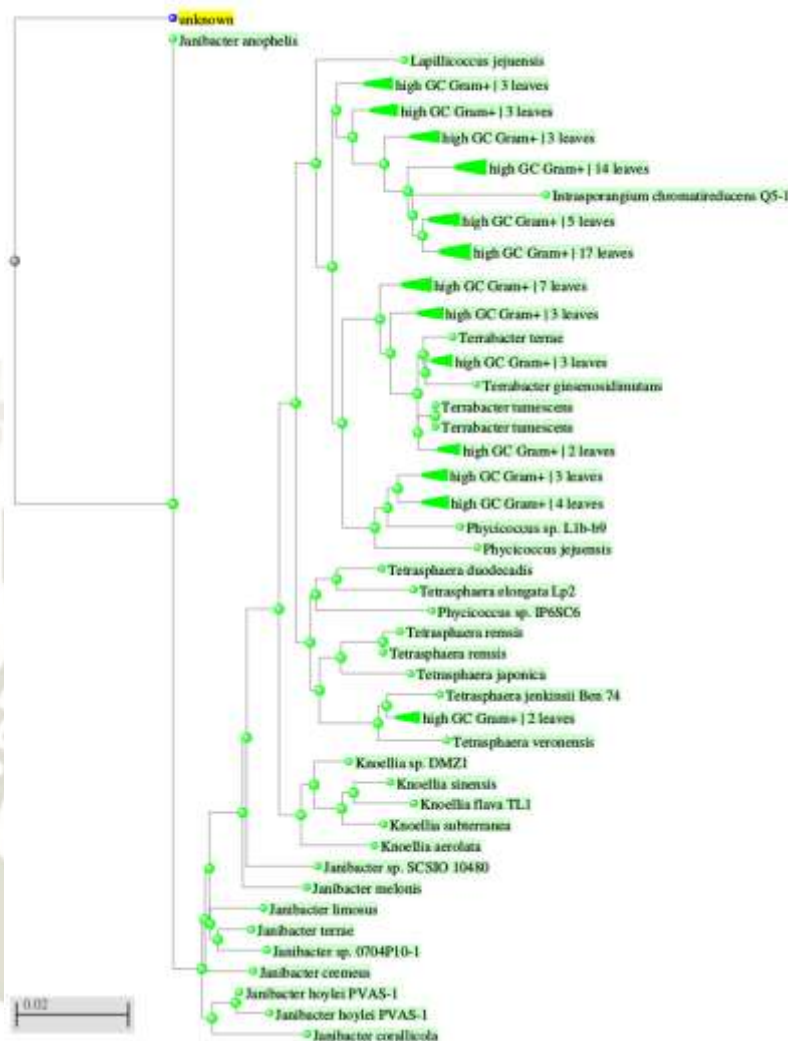


Figura 13. Árbol filogenético de secuencia CR.

En la **Figura 14** se muestra el resumen de los requerimientos de alineamiento para la cepa de color blanco (CB); sin embargo, en la **Figura 15** se observa que después de un largo proceso de búsqueda, sólo se encuentran 4 especies que comparten cierto porcentaje de homología.

La **Figura 16** nos indica que la cepa CB forma parte del grupo de las Proteobacterias, en su mayoría son del tipo gram negativas, por lo que al encontrarse con similar acción a las *Alphaproteobacterias* las cuales son capaces de metabolizar cadenas carbonadas, también se encuentran a las *Gallaecimonas pentaromativorans*, las cuales degradan hidrocarburos aromáticos policíclicos de cuatro y cinco anillos de alta masa molecular y finalmente cierto parecido con la *Burkholderia mallei* la cual es un patógeno, por lo que si observamos en la **Figura 17** vemos a esta especie más alejada de la especie CB.

Search Parameters	
Program	blastn
Word size	11
Expect value	10
Hitlist size	100
Match/Mismatch scores	2,-3
Gapcosts	5,2
Low Complexity Filter	Yes
Filter string	L;m;
Genetic Code	1
Template length	18
Window Size	40

Database	
Posted date	Jan 28, 2018 5:18 PM
Number of letters	28,602,801
Number of sequences	19,670
Entrez query	None

Karlin-Altschul statistics		
Lambda	0.633731	0.625
K	0.408146	0.41
H	0.912438	0.78

Results Statistics	
Length adjustment	27
Effective length of query	1307
Effective length of database	28071711
Effective search space	36689726277
Effective search space used	36689726277

Figura 14. Resumen de análisis de alineamiento múltiple en BLAST de la secuencia de CB.

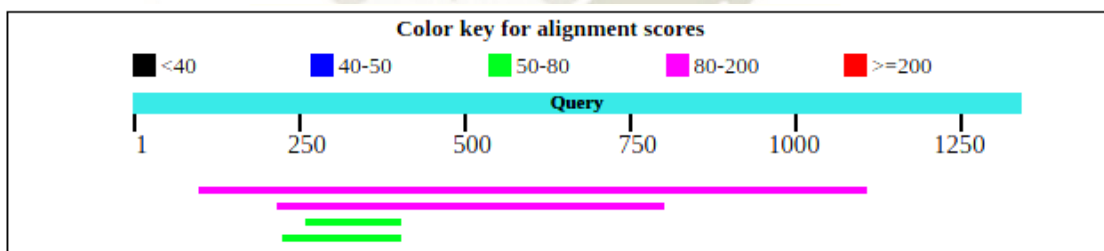


Figura 15. Resumen gráfico de los alineamientos de secuencias nucleotídicas para CR.

Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	Description
<input type="checkbox"/> Proteobacteria	4	4	
<input type="checkbox"/> Gallaecimonas pentaromativorans	1	1	Gallaecimonas pentaromativorans hits
<input type="checkbox"/> Burkholderia mallei	1	1	Burkholderia mallei hits
<input checked="" type="checkbox"/> Alphaproteobacteria	2	2	

Figura 16. Análisis taxonómico de los alineamientos de mayor puntuación para CB.

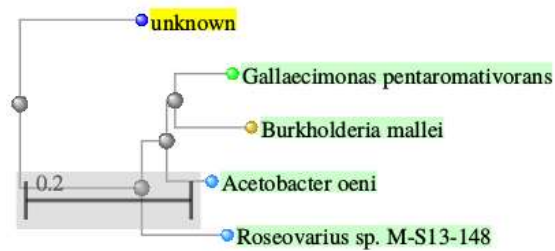


Figura 17. Árbol filogenético de secuencia CB.

3.6 ENSAYOS DE PARÁMETROS DE ACTIVIDAD BIODEGRADATIVA

3.6.1 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN MEDIO ENRIQUECIDO CON DIÉSEL

Una vez inoculados los reactores se procedió a determinar la concentración microbiana diariamente mediante conteo por cámara de Neubauer para la conformación de las curvas de crecimiento que permitieron obtener información sobre el comportamiento y adaptabilidad tanto de la especie CR como de CB. Los promedios de las concentraciones para ambas cepas se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Concentración microbiana expresada en cel/mL con respecto al tiempo en días para CR y CB.

Día	Concentración de microorganismos CR (cel/mL)	Concentración de microorganismos CB (cel/mL)
0	3.500.E+05	2.800.E+05
1	1.540.E+06	1.010.E+06
2	3.860.E+06	3.240.E+06
3	4.780.E+06	4.760.E+06
4	8.570.E+06	4.980.E+06
5	9.890.E+06	5.790.E+06
6	1.185.E+07	6.330.E+06
7	1.340.E+07	8.160.E+06
8	1.391.E+07	9.230.E+06
13	1.326.E+07	9.500.E+06

Los seguimientos del crecimiento dan una idea del tiempo que toma la población de cada una de las especies de interés para adaptarse al medio de cultivo enriquecido con glucosa y diésel (fase de latencia), del tiempo que toma en duplicarse a mayor velocidad (fase exponencial) y el tiempo en el que se mantiene en crecimiento constante antes de la mortalidad (fase estacionaria). Las curvas de crecimiento de las cepas CR y CB se muestran en la

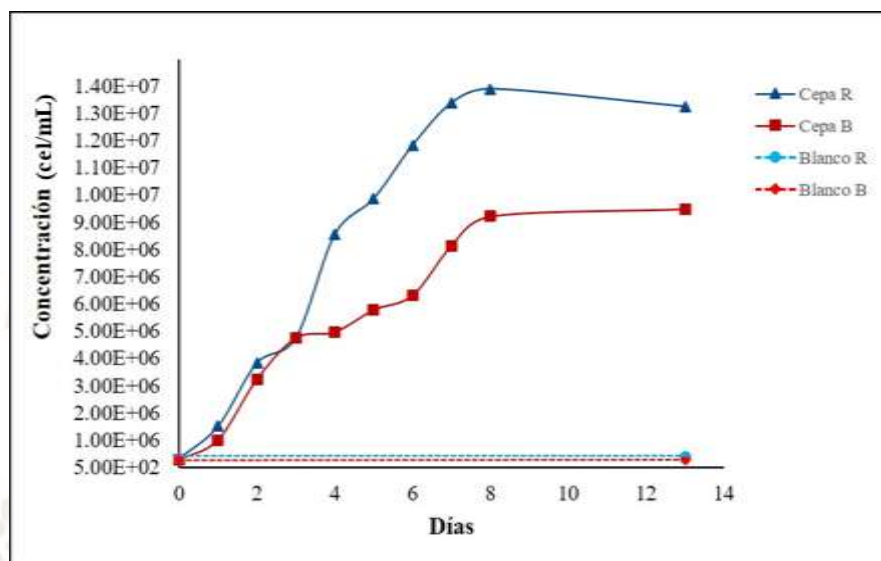


Figura 18. Curvas de crecimiento de aislamientos nativos de suelo contaminado, en medio líquido MMDG. Dónde: Cepa R= CR, Cepa B= CB, Blanco R y Blanco B= Blanco de CR y Blanco de CB.

En la curva correspondiente a CR se podría inferir una fase de adaptación hasta antes del día 3, dándose el mayor crecimiento microbiano a partir del día 3 hasta antes del día 8 que correspondería a la fase exponencial, mientras que a partir del día 8 se dio una ligera disminución poblacional. En el caso de CB, se puede apreciar que tiene un periodo de latencia más largo, a partir del día 6 en que comenzaría la fase exponencial hasta el día 8; sin embargo, CB no mostró descenso en cuanto a concentración poblacional hasta el día 13, por lo que tendría mayor tiempo de degradación de sustrato a comparación de CR; aun así, CR presentaría mayor concentración de microorganismos en periodos más cortos de tiempo.

En la **Figura 19** se puede visualizar la distribución del conjunto de datos de concentración microbiana al día 0 de la cepa R (CR) y cepa B (CB), respectivamente.

Tal y como se muestra descrita detalladamente en la **Tabla 5**, las concentraciones de microorganismos en los reactores mostraron valores promedios de 2.80×10^5 (con límite de confianza de ± 381186) cel/mL para CB y de 3.5×10^5 (con límite de confianza de ± 254124) cel/mL para CR al día 0 de experimentación. Para los reactores de los blancos para CB y CR se obtuvieron valores promedios de 2.85×10^5 (con límite de

confianza de ± 190593) y de 3.50×10^5 (con límite de confianza de ± 127062) cel/mL, respectivamente.

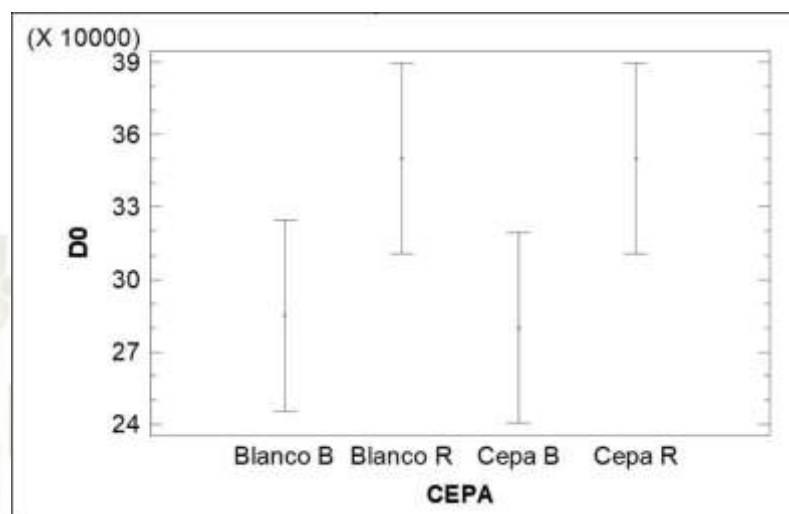


Figura 19. Concentración de microorganismos CR y CB en medio de cultivo al día 0.

Tabla 5. Análisis estadístico descriptivo para la concentración de microorganismos al día 0.

	Blanco B	Blanco R	Cepa B	Cepa R
Recuento	2	2	2	2
Promedio	$2.85 \times 10^5 \pm 190593$	$3.50 \times 10^5 \pm 127062$	$2.80 \times 10^5 \pm 381186$	$3.5 \times 10^5 \pm 254124$
Desviación Estándar	2.12×10^4	1.41×10^4	4.24×10^4	2.83×10^4
Coefficiente de Variación	7.44%	4.04%	15.15%	8.08%
Mínimo	2.70×10^5	3.40×10^5	2.50×10^5	3.30×10^5
Máximo	3.00×10^5	3.60×10^5	3.10×10^5	3.70×10^5
Rango	3.00×10^4	2.00×10^4	6.00×10^4	4.00×10^4

La **Tabla 6** descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 3.75, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es mayor que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para comprobarlo, se aplicó una Pruebas de Múltiples Rangos.

Tabla 6. Análisis de varianza para la concentración de microorganismos CR y CB al día 0.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9.1375×10^9	3	3.04583×10^9	3.75	0.1172
Intra grupos	3.25×10^9	4	8.125×10^8		
Total (Corr.)	1.23875×10^{10}	7			

En las Pruebas de Rangos Múltiples, los intervalos alrededor de cada promedio están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Estos intervalos se usan para determinar cuáles variables son significativamente diferentes de otras y el resultado de su análisis se muestra en la **Tabla 7**. Aquí se presentan los resultados de un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La letra asignada a cada concentración indica si existe o no diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95.0% de confianza entre las 4 variables. Como se puede observar, las medias de cada variable comparten la misma letra (a), por lo que se pudo determinar que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de comparación entre CB, CR, blanco B y blanco R; este comportamiento probablemente se debió a que los microorganismos aún no alcanzaban periodos de duplicación al tiempo 0 en días.

Tabla 7. Comparaciones múltiples según método (LSD) de Fisher para la concentración de microorganismos al día 0.

Tiempo de contacto	Cel/mL
Cepa B	$2.80 \times 10^5 \pm 381186^a$
Blanco B	$2.85 \times 10^5 \pm 190593^a$
Cepa R	$3.5 \times 10^5 \pm 254124^a$
Blanco R	$3.50 \times 10^5 \pm 127062^a$

En los análisis de varianzas de la concentración de microorganismos presente en el medio de cultivo por cada cepa, con respecto al tiempo total de experimentación correspondientes a la **Tabla 8** y **Tabla 9**, se puede afirmar que, puesto que los valores-P son menores que 0.05, sí existe diferencia estadísticamente significativa en cuanto a

la concentración de microorganismos en el medio de cultivo inoculado con cepa R (CR) y también en el medio de cultivo inoculado con cepa B (CB).

Tabla 8. Análisis de varianza para la concentración de microorganismos CR.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.76599×10^{14}	9	5.29554×10^{13}	21.48	0.0000
Intra grupos	2.46486×10^{13}	10	2.46486×10^{12}		
Total (Corr.)	5.01247×10^{14}	19			

Tabla 9. Análisis de varianza para la concentración de microorganismos CB.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.816×10^{14}	9	2.01777×10^{13}	348.73	0.0000
Intra grupos	5.786×10^{11}	10	5.786×10^{10}		
Total (Corr.)	1.82178×10^{14}	19			

La **Tabla 10** muestra el análisis comparativo de las concentraciones de microorganismos presentes en cada uno de los días de ensayo para la cepa R (CR), en él se distingue que existen diferencias estadísticamente significativas de la cuantificación de población microbiana a partir del segundo día de ensayo, y es hasta el día 4 en el que se aprecia la generación de aparentemente una población más adaptada. A partir del día 4 al día 6, los datos comparten cierta tendencia de crecimiento, de igual manera ocurre del día 7 al día 13 en el que la tendencia de crecimiento disminuye.

En cuanto a la cepa B (CB) el conteo presenta diferencias significativa el primer y segundo día, el tercer y cuarto día comparten cierta estabilidad en cuanto al crecimiento microbiano. Mientras que los días 5, 6, 7 y 8 vuelven a mostrar diferencias significativas entre sí; finalmente, el día 13 se mantiene similar al crecimiento del día 8.

Una vez evidenciado el comportamiento de ambas cepas durante el tiempo de experimentación, se procedió a determinar estadísticamente las diferencias en cuanto a crecimiento microbiano al haber finalizado el tiempo de experimentación (día 13). En la **Figura 20** se puede visualizar la distribución del conjunto de datos tanto de las cepas (CB y CR) como de los blancos respectivos.

Tabla 10. Comparaciones múltiples (LSD) de Fisher para las concentración de microorganismos durante el tiempo experimental.

Tiempo de contacto	CR		CB
D0	$3.5 \times 10^5 \pm 2.54 \times 10^{5a}$	D0	$2.8 \times 10^5 \pm 3.8 \times 10^{5a}$
D1	$1.54 \times 10^6 \pm 2.54 \times 10^{5ab}$	D1	$1.01 \times 10^6 \pm 2.54 \times 10^{5b}$
D2	$3.86 \times 10^6 \pm 4.07 \times 10^{6b}$	D2	$3.24 \times 10^6 \pm 1.65 \times 10^{6c}$
D3	$4.78 \times 10^6 \pm 2.41 \times 10^{6b}$	D3	$4.76 \times 10^6 \pm 2.03 \times 10^{6d}$
D4	$8.57 \times 10^6 \pm 2.67 \times 10^{6c}$	D4	$4.98 \times 10^6 \pm 3.30 \times 10^{6d}$
D5	$9.88 \times 10^6 \pm 9.15 \times 10^{6cd}$	D5	$5.79 \times 10^6 \pm 2.41 \times 10^{6e}$
D6	$1.19 \times 10^7 \pm 2.10 \times 10^{7cde}$	D6	$6.33 \times 10^6 \pm 1.91 \times 10^{6f}$
D7	$1.34 \times 10^7 \pm 3.68 \times 10^{7e}$	D7	$8.16 \times 10^5 \pm 6.35 \times 10^{5g}$
D8	$1.39 \times 10^7 \pm 8.89 \times 10^{6e}$	D8	$9.23 \times 10^6 \pm 1.52 \times 10^{6h}$
D13	$1.33 \times 10^7 \pm 0^{de}$	D13	$9.5 \times 10^6 \pm 4.07 \times 10^{6h}$

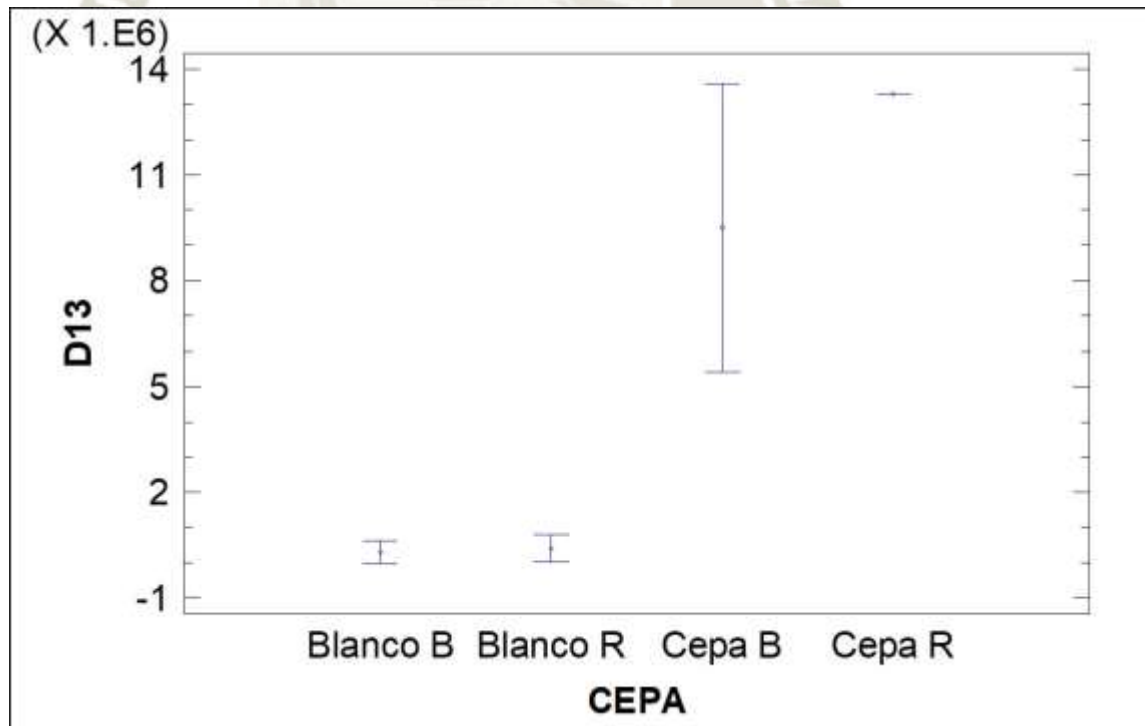


Figura 20. Concentración de microorganismos para las cepas CR y CB al día 13.

Tal y como se muestra descrita detalladamente en la **Tabla 11**, las concentraciones microbianas en los reactores que contenían a cada uno de los microorganismos mostraron valores promedios de 9.50×10^6 (con un límite de confianza de $\pm 4.07 \times 10^6$) para CB y de 1.33×10^7 (con un límite de confianza de $\pm 0.1 \times 10^7$) para CR al día 13 de experimentación. Para los reactores de los blancos para CB y CR se obtuvieron valores promedios de 3×10^5 (con un límite de confianza de $\pm 3.18 \times 10^5$) y de 4.2×10^5 (con un límite de confianza de $\pm 3.81 \times 10^5$), respectivamente.

En la

Tabla 12 se presenta un análisis de varianza para la concentración de microorganismos presentes en el medio de cultivo al día 13. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para comprobarlo, se realizó una Pruebas de Múltiples Rangos.

Tabla 11. Análisis estadístico descriptivo para la concentración de microorganismos al día 13.

	Blanco B	Blanco R	Cepa B	Cepa R
Recuento	2	2	2	2
Promedio	$3. \times 10^5 \pm 3.18 \times 10^5$	$4.2 \times 10^5 \pm 3.81 \times 10^5$	$9.50 \times 10^6 \pm 4.07 \times 10^6$	$1.33 \times 10^7 \pm 0$
Desviación Estándar	3.54×10^4	4.24×10^4	4.53×10^5	1.00
Coefficiente de Variación	11.59%	10.10%	14.76%	8.001%
Mínimo	2.80×10^5	3.90×10^5	9.18×10^6	1.33×10^7
Máximo	3.30×10^5	4.50×10^5	9.82×10^6	1.33×10^7
Rango	5.00×10^4	6.00×10^4	6.40×10^5	0.06×10^7

Tabla 12. Análisis de varianza para la concentración de microorganismos al día 13.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.58106E14	3	8.60353E13	1655.72	0.0032
Intra grupos	2.0785E11	4	5.19625E10		

Total (Corr.) 2.58314E14

7

El resultado de las Pruebas de Rangos Múltiples de se muestra en la **Tabla 13**. Como se puede observar, las medias de cada variable comparten la misma letra (a), por lo que se pudo determinar que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de comparación del blanco B y blanco R; este comportamiento probablemente se debió a que ambos sistemas no presentaron crecimiento poblacional significativo porque no fueron inoculados. A diferencia de los sistemas que fueron inoculados con CR y CB, los cuales sí muestran diferencia significativa en cuanto el crecimiento microbiano al día 13.

Tabla 13. Comparaciones múltiples según método (LSD) de Fisher para la concentración de microorganismos al día 13.

Tiempo de contacto	Cel/ml
Blanco R	$4.2 \times 10^5 \pm 3.81 \times 10^{5a}$
Blanco B	$3. \times 10^5 \pm 3.18 \times 10^{51a}$
Cepa B	$9.50 \times 10^6 \pm 4.07 \times 10^{6b}$
Cepa R	$1.33 \times 10^7 \pm 0^c$

El aumento de la densidad poblacional en cuanto al número de microorganismos determinados en el medio de cultivo líquido MMDG a los largo de los 13 días de experimentación muestra que existe un crecimiento de población en el medio de cultivo. Este crecimiento tiene lugar debido al consumo de las fuentes de carbono y energía (glucosa y diésel), por lo que la energía aportada por el diésel es proporcional a la producción de biomasa.

Si bien es importante determinar la variación de la concentración de microorganismos presentes en el medio como parámetro indicador del metabolismo de las bacterias sobre los hidrocarburos presentes, es la disminución de la concentración de glucosa y diésel lo que permitió confirmar que este parámetro se encuentra ligado a actividades metabólicas específicas, estas disminuciones fueron cuantificadas por el método gravimétrico de extracción por solvente con diclorometano y por el método Glucosa PAP-SL/Espectrofotómetro, respectivamente.

3.6.2 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS POR MÉTODO GRAVIMÉTRICO

Los datos de la **Tabla 14** muestran que en el reactor con la Cepa R, la concentración de diésel en el medio de cultivo varía desde 1.12 % hasta 0.45 %; asimismo, en el caso de los reactores inoculados con la cepa B, dicha concentración varía desde 1.23 % hasta 0.65 %. Esta determinación fue medida por método gravimétrico con diclorometano como solvente, durante los días 0, 2, 5, 8 y 13 a partir de su inoculación.

Tabla 14. Concentración de hidrocarburos con respecto al tiempo en medio de cultivo MMDG con presencia de cepas CR y CB.

Día	Cepa R	Cepa B
D0	1.1219+/-0.0331	1.2400+/-0.0409
D2	1.0602+/-0.0331	1.1816+/-0.0409
D5	0.894+/-0.0331	0.9287+/-0.0409
D8	0.6352+/-0.0331	0.7085+/-0.0409
D13	0.4503+/-0.0331	0.656+/-0.0409

En la **Figura 21**, la gráfica de tendencias aparentemente evidencia la variación en cuanto a la concentración de hidrocarburos en el día 0 y el día 13 para las cepas y sus blancos, para su confirmación se realizaron las pruebas estadísticas necesarias.

Tal y como se muestra descrita detalladamente en la

Tabla 15, las concentraciones en los reactores que contenían a cada uno de los microorganismos mostraron valores promedios de 1.24 (con límite de confianza de +/-0.09) para CB y de 1.12 (con límite de confianza de +/-0.07) para CR al día 0 de experimentación. Para los reactores de los blancos para CB y CR se obtuvieron valores promedios de 1.17 (con límite de confianza de +/-0.08) y de 1.06 (con límite de confianza de +/-0.08), respectivamente.

En la **Figura 22** se muestra la gráfica de las concentraciones de diésel presente en los reactores con CB y CR y sus respectivos blancos al día 0 representados por sus desviaciones estándar. La verificación de varianza realizada según la prueba de

Levene's dio un valor-p de 0.9914 (Valor-P>0.05) por lo cual se puede decir que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza.

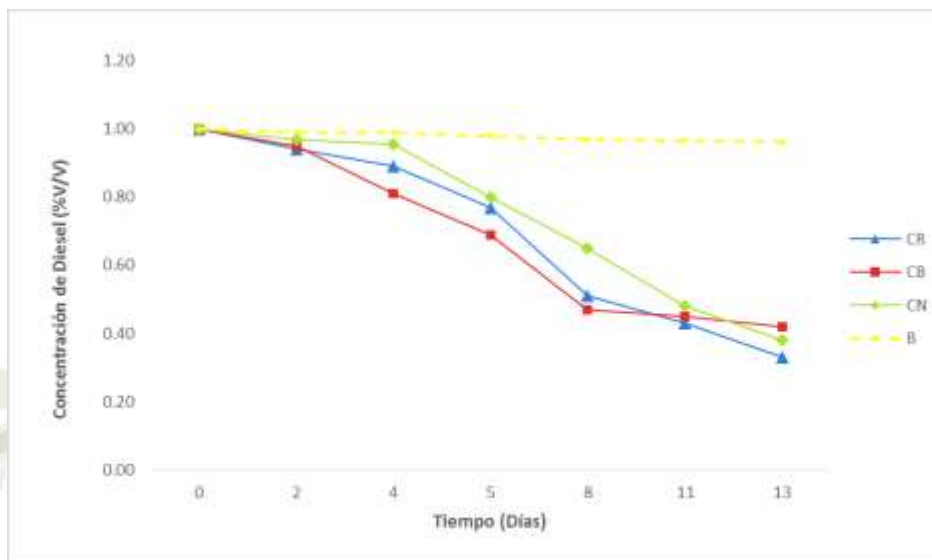


Figura 21. Concentración de diésel con respecto al tiempo en medio de cultivo líquido MMDG para las cepas CR, CB y CN.

Tabla 15. Análisis estadístico descriptivo para la concentración de diésel al día 0.

	Blanco B	Blanco R	Cepa B	Cepa R
Recuento	3	3	3	3
Promedio	1.1775+/-0.0871	1.0687+/-0.0893	1.24+/-0.0991	1.1219+/-0.0711
Desviación Estándar	0.0351	0.0359	0.0399	0.0286
Coefficiente de Variación	2.98%	3.36%	3.22%	2.55%
Mínimo	1.1514	1.0329	1.1944	1.0975
Máximo	1.2174	1.1047	1.2685	1.1534
Rango	0.0660	0.0719	0.0741	0.0559
Sesgo Estandarizado	1.0526	0.0255	-1.1109	0.7443

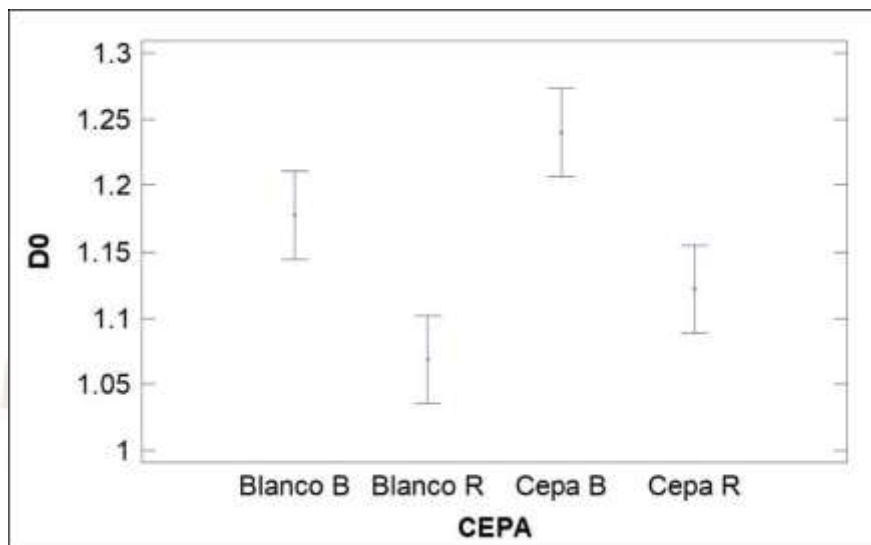


Figura 22. Concentración de diésel en al día 0 en medio de cultivo MMDG con presencia de cepas CR y CB.

La **Tabla 16** descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 13.1785, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se seleccionó una Pruebas de Múltiples Rangos.

Tabla 16. Análisis de varianza para la concentración de diésel al día 0.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0487334	3	0.0162445	13.18	0.0018
Intra grupos	0.00986121	8	0.00123265		
Total (Corr.)	0.0585947	11			

En las Pruebas de Rangos Múltiples, los intervalos alrededor de cada promedio están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Estos intervalos se usan para determinar cuáles variables son significativamente diferentes de otras y el resultado de su análisis se muestra en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Comparaciones múltiples (LSD) Fisher para las concentraciones de diésel en medio de cultivo con Cepa R (CR), Cepa B (CB) al día 0.

Microorganismo / Testigo	ml/100ml
Blanco R	1.0687+/-0.0893 ^a
Cepa R	1.1219+/-0.0711 ^{ab}
Blanco B	1.1775+/-0.0871 ^{bc}
Cepa B	1.24+/-0.0991 ^c

La **Tabla 17** aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La letra asignada a cada concentración indica si existe o no diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95.0% de confianza entre las 4 variables. No existe diferencia estadísticamente significativa entre los niveles que comparten la misma letra; por esto, se puede aseverar que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de Blanco R y cepa R, ni entre blanco B y cepa B; este comportamiento se podría deber a que los reactores fueron preparados por bloques (por cepa) para luego ser ensayados al día 0; mientras que las medias entre blanco R y blanco B sí muestran diferencia estadísticamente significativa probablemente también debido a que fueron preparados en distintos bloques. En los análisis de varianzas de la concentración de diésel presente en el medio de cultivo por cada cepa, con respecto al tiempo total de experimentación correspondientes a la Tabla 18 y Tabla 19 se puede afirmar que, puesto que los valores-P son menores que 0.05 existe diferencia estadísticamente significativa en cuanto a las concentraciones de diésel del medio de cultivo inoculado con cepa R (CR) y también en el medio de cultivo inoculado con cepa B (CB).

Tabla 18. Análisis de varianza de la concentración de diésel en medio de cultivo con microorganismos CR.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.973076	4	0.243269	183.30	0.001
Intra grupos	0.013272	10	0.0013272		
Total (Corr.)	0.986348	14			

Tabla 19. Análisis de varianza de la concentración de diésel en medio de cultivo con microorganismo CB.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.848049	4	0.212012	104.96	0.0015
Intra grupos	0.0201986	10	0.00201986		
Total (Corr.)	0.868248	14			

La **Tabla 20** aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes comparando las concentraciones de diésel en el medio de cultivo de ambas cepas en simultáneo durante el tiempo de ejecución de los experimentos. En esta comparación, se le asigna una letra al valor de las medias para diferenciar los grupos homogéneos de los que presentan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 20. Comparaciones múltiples (LSD) de Fisher de la concentración de diésel en medio de cultivo para cepa R (CR) y cepa B (CB).

Tiempo de contacto	CR	CB
D0	1.1219+/-0.0331 ^a	1.2400+/-0.0409 ^a
D2	1.0602+/-0.0331 ^a	1.1816+/-0.0409 ^a
D5	0.894+/-0.0331 ^b	0.9287+/-0.0409 ^b
D8	0.6352+/-0.0331 ^c	0.7085+/-0.0409 ^c
D13	0.4503+/-0.0331 ^d	0.656+/-0.0409 ^c

Luego de realizar la comparación múltiple (LSD) de Fisher, se pudo determinar que no existe diferencia significativa entre las concentraciones de diésel de los días 0 y 2 en medio de cultivo con CR, sin embargo; sí existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los días 2, 5, 8 y 13, lo que podría deberse que en los primeros días de ser inoculado el microorganismo CR, la degradación fue lenta porque estaba en fase de adaptación al medio de cultivo con hidrocarburos. Del mismo modo, no existe diferencia significativa entre las concentraciones de diésel de los días 0 y 2 en medio de cultivo con CB, siendo el día 5 el que presenta diferencia significativa tanto de la concentración de diésel en el día 2 como la del día 8; finalmente, entre el día 8 y 13 tampoco existe diferencia estadísticamente significativa. Esto contrasta con

el gráfico de tendencia y evidencia que la degradación se dio de forma lenta en los primeros días (0 y 2) y en los últimos (8 y 13).

En ambos casos (concentración de diésel en reactores con CR y CB) se evidencian diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores de los días 0 y 13; comprobándose estadísticamente la existencia de degradación de diésel en el medio de cultivo por parte de ambas cepas estudiadas. Una vez evidenciado el comportamiento de ambas cepas durante el tiempo de experimentación, se procedió a determinar estadísticamente la capacidad degradante al haber finalizado el tiempo de experimentación. En la **Figura 23** se puede visualizar la distribución del conjunto de datos tanto de las cepas (CB y CR) como de los blancos respectivos.

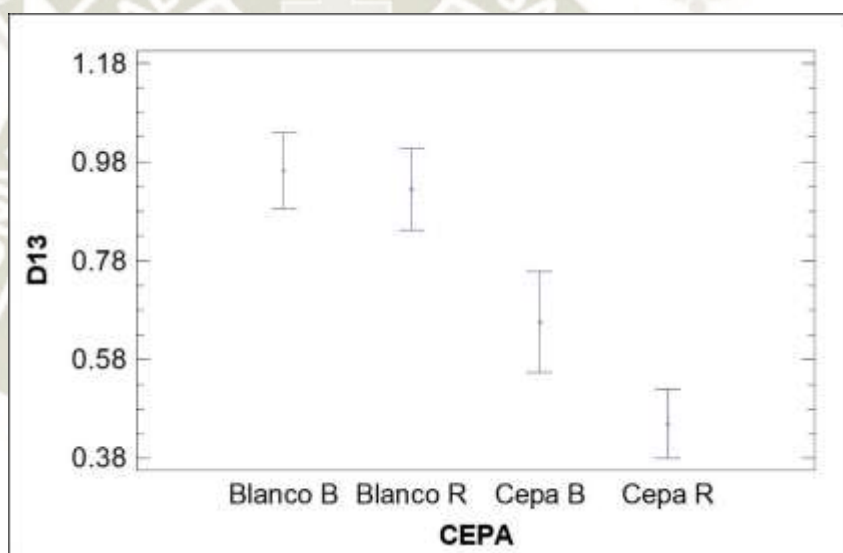


Figura 23. Concentración de hidrocarburos en medio de cultivo con cepas CB y CR y sus respectivos blancos al día 13.

Tal y como se muestra descrita detalladamente en la **Tabla 21**, las concentraciones de diésel en los reactores que contenían a cada uno de los microorganismos mostraron valores promedios de 0.656 (con un límite de confianza de +/-0.1023) para CB y de 0.4503 (con un límite de confianza de +/-0.0694) para CR al día 13 de experimentación. Para los reactores de los blancos para CB y CR se obtuvieron valores promedios de 0.962 (con un límite de confianza de +/-0.0772) y de 0.9241 (con un límite de confianza de +/-0.0833), respectivamente.

Tabla 21. Análisis estadístico descriptivo para concentración de diésel al día 13.

	Blanco B	Blanco R	Cepa B	Cepa R
Recuento	3	3	3	3
Promedio	0.962+/-0.0772	0.9241+/-0.0833	0.656+/-0.1023	0.4503+/-0.0694
Desviación Estándar	0.0311	0.0335	0.0412	0.0279
Coefficiente de Variación	3.23%	3.63%	6.28%	6.20%
Mínimo	0.9285	0.8907	0.6161	0.4213
Máximo	0.9899	0.9578	0.6984	0.4770
Rango	0.0614	0.0671	0.0823	0.0557
Sesgo Estandarizado	-0.5425	0.0209	0.1960	-0.2791

La verificación de varianza realizada según la prueba de Levene's dio un valor-p de 0.952852 (Valor-P>0.05) por lo cual se puede decir no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza.

La **Tabla 22** muestra que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se seleccionó una Pruebas de Múltiples Rangos.

Tabla 22. Análisis de varianza para concentración de diésel al día 13.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.521607	3	0.173869	152.27	0.0035
Intra grupos	0.00913466	8	0.00114183		
Total (Corr.)	0.530742	11			

Con respecto a la **Tabla 23**, se comprueba estadísticamente que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de la Cepa R (CR) y Cepa B (CB). Debido a que la concentración inicial de diésel presente en el medio de cultivo al día 0 de experimentación con presencia de CR fue de 1.12+/-0.03 % y al día 13 de 0.45+/-0.03 %, se obtiene un porcentaje de disminución de diésel del 59.82% para la cepa CR

en los 13 días de actividad microbiana. Sin embargo, el blanco al día 13 de ensayo presentó una concentración de 0.92 % +/- 0.0833, diferenciándose del reactor inoculado en un porcentaje de 51.27%. Se puede inferir que la diferencia de los porcentajes de disminución de hidrocarburos entre el día 0 y el blanco R (8.55%) corresponde a la pérdida de hidrocarburos volátiles durante los 13 días de ensayo.

La concentración inicial de diésel, presente en el medio de cultivo al día 0, con presencia de CB fue de 1.24+/-0.04 % y al día 13 de 0.65+/-0.04 %, se obtiene un porcentaje de disminución de diésel del 47.58% para la cepa CB en los 13 días de actividad microbiana. Sin embargo, el blanco al día 13 de ensayo presentó una concentración de 0.96% +/- 0.07, diferenciándose del reactor inoculado en un porcentaje de 32.84%. Se puede inferir que la diferencia de los porcentajes de disminución de hidrocarburos entre el día 0 y el blanco B (14.74%) corresponde a la pérdida de hidrocarburos volátiles durante los 13 días de ensayo.

En el caso del diésel, tanto las cepas CB y CR, probablemente utilizaron una fracción de este como fuente de carbono y de energía. Es importante mencionar que el diésel contiene varias formas de hidrocarburos y que las cepas poseen la maquinaria enzimática para utilizar algunos compuestos del diésel (79).

Tabla 23. Comparaciones múltiples (LSD) Fisher para las concentraciones de diésel en medio de cultivo con Cepa R (CR), Cepa B (CB) al día 13.

Tiempo de contacto	ml/100ml
Cepa R	0.4503+/-0.0694 ^a
Cepa B	0.656+/-0.1023 ^b
Blanco R	0.9241+/-0.0833 ^c
Blanco B	0.962+/-0.0772 ^c

3.6.3 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA POR MÉTODO GLUCOSA PAP-SL/ESPECTROFOTÓMETRO

En la **Tabla 24** se pueden apreciar las medias de las concentraciones de glucosa para cada reactor por día de ensayo, determinadas por el método enzimático-colorimétrico con Glucosa PAP-SL/Espectrofotómetro.

Tabla 24. Concentración de glucosa en reactores inoculados con cepa R (CR) y cepa B (CB).

Día	Concentración de glucosa (g/L) cepa R	Concentración de glucosa (g/L) cepa B
0	2.4651246	2.258301
2	2.1489406	1.526399
5	1.6618756	1.282000
8	2.2679250	0.880333
13	2.3396380	0.606000

La variación de las concentraciones de glucosa en el tiempo, dan una idea de cómo es que las especies microbianas utilizan a la glucosa como sustrato para adaptarse al medio de cultivo enriquecido. Las gráficas de tendencia de concentración de glucosa de las cepas CR y CB se muestran en la **Figura 24**.

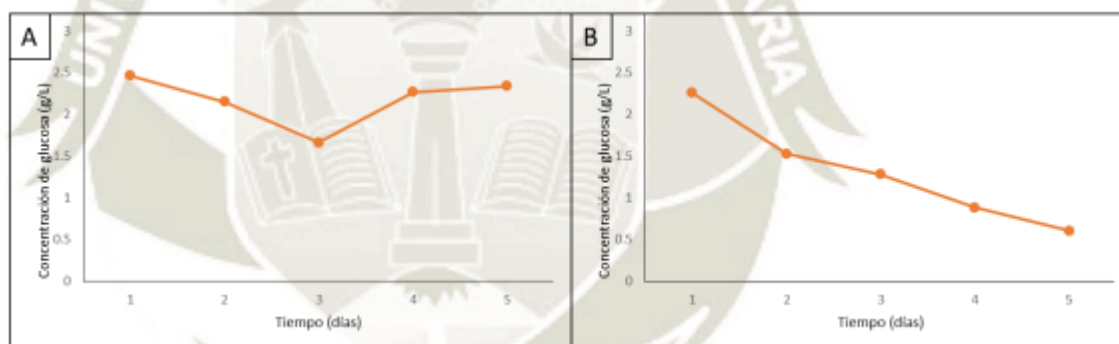


Figura 24. Concentración de glucosa en medio de cultivo. Dónde: A) Concentración de glucosa en reactor con Ceba R (CR). B) Concentración de glucosa en reactor con Ceba B (CB).

En el trabajo realizado por Braibant, las pruebas en erlenmeyers permiten obtener una idea preliminar, a pequeña escala, de los potenciales de degradación de los hidrocarburos por las bacterias. El consumo de glucosa implica la liberación de ácidos orgánicos en el medio, lo que provoca una disminución del pH cuando utiliza testigos positivos solo con glucosa como fuente carbonada en el medio de cultivo con presencia de especies bacterianas caracterizadas por su tolerancia y potencial de degradación de hidrocarburos, observándose en varios caso de que a las 24 horas de que el medio es inoculado, el pH bajó de 6.81 a 4.18; mientras que a las 168 horas de ensayos, se

registró un pH de 4.90. La digestión de la glucosa parece empezar antes que la de hidrocarburos como el hexadecano (79).

El cometabolismo consiste en un metabolismo concomitante de dos sustratos, uno de ellos permite a la célula obtener energía para el crecimiento mientras que el otro es metabolizado en paralelo sin que aporte ningún elemento indispensable para esta. Si los sustratos son de naturaleza similar, ocurrirá una degradación preferencial y el sustrato principal puede en mismo tiempo preparar a la bacteria para la degradación del co-sustrato (113).

En el trabajo realizado por Ganesh (114), se realizaron ensayos de degradación adicionales en medios líquidos usando glucosa como un complemento de nutrientes. Se determinó que un aumento en la concentración de glucosa en los medios dio como resultado un aumento en la degradación del diésel bajo las condiciones de ensayo de degradación estándar. La degradación del diésel en presencia de glucosa al 0.1% fue de 76.02, 74.36, 65.32 y 80.22% para los aislamientos D2, D9, D10 y DJLB respectivamente. El porcentaje de degradación del diésel subió a 80, 82.7, 65.4 y 83.12% para los aislamientos D2, D9, D10 y DJLB respectivamente con la presencia de glucosa al 1%, en comparación con 62, 61, 56 y 73.1% sin glucosa. Estos resultados indican que la adición de concentraciones de glucosa incrementadas al medio líquido aumentó sustancialmente la velocidad de degradación del diésel. El crecimiento microbiano es otra variable que presenta un incremento estadísticamente significativo con la adición de glucosa al medio de cultivo (114).

En la presente investigación, la concentración de glucosa utilizada fue de 0.2 %, obteniendo porcentajes de degradación de diésel de 51.27 % y 32.84 % en los reactores con presencia de las cepa CR y la cepa CB, respectivamente. El menor, aunque estadísticamente significativo porcentaje de degradación de la cepa CB, pudo ser debido al pH bajo utilizado en el medio de cultivo, exigiendo la presencia de microorganismos tolerantes a la acidez que, aun así, mostraron comportamiento de adaptabilidad al medio.

En la investigación realizada por Gargouri (115), se cultivaron cepas en medio de cultivo con hexadecano y glucosa para determinar el aumento de hidrofobicidad de los

microorganismos por la producción de biosurfactantes. La hidrofobicidad celular alcanzó aproximadamente 78 y 85.4% con cepas *Trichosporon* y *Candida*, respectivamente. Durante los estudios, y para ambas cepas de levadura, se tiene en cuenta de que el máximo aumento de la hidrofobicidad se correlaciona con la biodegradación máxima de hexadecano (o TPH). Se encontró una relación directa entre la hidrofobicidad celular de las cepas de levadura y la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo. En base a los datos obtenidos del crecimiento y la hidrofobicidad celular, la hidrofobicidad de la superficie celular podría proponerse como el mecanismo más probable para la absorción de hexadecano por las cepas de levadura probadas. El aumento de la hidrofobicidad celular por ambas cepas de levadura durante el crecimiento en hexadecano indicó que las cepas podrían emplear captación de alcanos mediada por biosurfactante. De hecho, Prabhu y Phale sugieren que la producción de biosurfactantes y la hidrofobicidad de la superficie celular desempeñan un papel importante en la captación de hidrocarburos. La hidrofobicidad celular puede considerarse uno de los factores importantes que controlan la asimilación de hidrocarburos (115).

3.6.4 DETERMINACIÓN DE pH

En la **Tabla 25** se pueden apreciar las medias del pH en cada reactor por cepa y por día de ensayo, cuantificado con un pHmetro digital.

Tabla 25. pH en reactores con medio de cultivo con Cepa R (CR) y Cepa B (CB).

DÍA	CEPA R (CR)	CEPA B (CB)
0	4.55	4.69
1	4.54	4.69
2	4.54	4.67
3	4.51	4.67
4	4.49	4.66
5	4.46	4.64
6	4.45	4.62
7	4.44	4.62
8	4.44	4.61
9	4.45	4.61
13	4.46	4.61
BLANCO	4.56	4.71

La tolerancia y adaptación al medio ácido, dan una idea del tipo de especies microbianas que se desarrollan en ambientes adversos y la utilidad selectiva que podrían tener a futuro. Las gráficas de tendencia de concentración de glucosa de las cepas CR y CB se muestran en la **Figura 25**. El pH contribuye significativamente a explicar la variación observada en la composición de una comunidad microbiana.

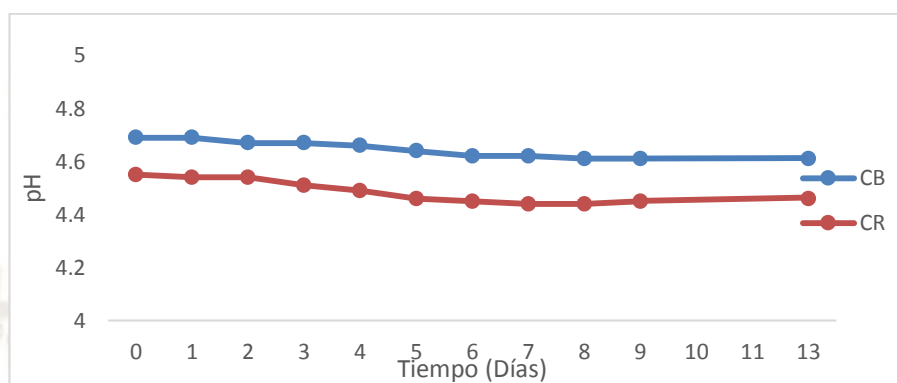


Figura 25. pH presente en medio de cultivo en presencia de CR y CB.

Se logró aislar dos acidobacterias correlacionadas con un pH bajo. La cepa R disminuyó el nivel de pH de 4.45 a 4.56; mientras que la cepa B mostró rangos de pH desde 4.69 a 4.61. Sin embargo, la presencia de acidobacterias en agua o suelo se correlacionan negativamente con altos niveles de HTP (hidrocarburos totales de petróleo). Lo que respalda la conclusión de que las acidobacterias son particulares.

Existen diferentes mecanismos para que las células se desarrollen de acuerdo a los cambios adversos que el ambiente les proporcione. Las respuestas de tolerancia al ácido son iniciadas por un mecanismo sensible a los inhibidores de la síntesis proteica y puede estabilizar el pH interno por sobre 5.0, teniendo un pH externo con valores de hasta 4.0. La pérdida de la actividad ATPasa, causada por las mutaciones que desorganizan genes o los inhibidores metabólicos, anula la respuesta de tolerancia al ácido pero no el mecanismo homeostático. Esta respuesta también puede proporcionar protección cruzada frente a otros agentes ambientales que puedan generar estrés al microorganismo. Es probable que la pigmentación de la cepa CR sea la expresión de un metabolito secundario que confiera a la célula capacidad de tolerancia a los avientes adversos u otras propiedades (5).

En la investigación realizada por Perez-Leblic *et al.*, el *phylum* mayoritario de todas las muestras analizadas fue el de Proteobacterias, seguido de los *phylum* de

Acidobacteria y Actinobacteria. Es importante resaltar que la muestra es la de menor diversidad microbiana, pues que solo se detectan 5 *phylum*, siendo las proteobacterias y las acidobacterias los grupos más representativos, lo que sugiere que podrían desempeñar un papel en los suelos más ácidos de las tierras de cultivo (116).

3.7 ENSAYOS DE PARÁMETROS DE ACTIVIDAD DEGRADATIVA DE CONSORCIO NATIVO MIXTO

Para la conformación de la curva de crecimiento que permitió obtener información sobre el comportamiento y adaptabilidad tanto de la especie CR como de CB, se determinó la concentración microbiana de los reactores diariamente mediante conteo por cámara de Neubauer. Los promedios de las concentraciones para ambas cepas se muestran en la **Tabla 26**.

El seguimiento del crecimiento da una idea del tiempo que toma la comunidad mixta del consorcio nativo para adaptarse al medio de cultivo enriquecido con glucosa y diésel.

Tabla 26. Concentración de microorganismos del consorcio nativo mixto en medio de cultivo líquido MMDG.

Día	Concentración del consorcio nativo mixto (cel/mL)
0	4.00E+05
1	2.00E+06
2	2.60E+06
3	4.20E+06
4	2.71E+06
5	3.75E+06
6	4.89E+06
7	4.78E+06
8	4.50E+06
9	6.46E+06
10	7.52E+06
11	7.21E+06

En la curva correspondiente al consorcio mixto, se podría inferir la existencia de diferentes poblaciones con capacidades degradantes particulares que interaccionan entre sí (**Figura 26**).

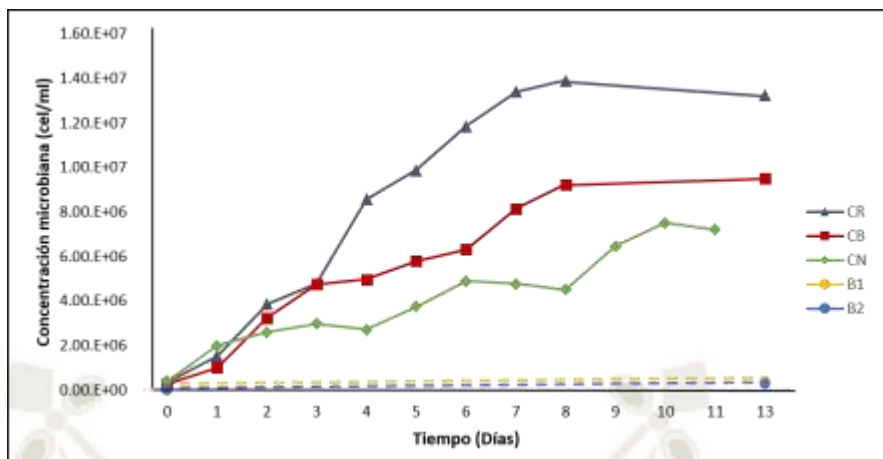


Figura 26. Curva de crecimiento de consorcio nativo mixto y de cepas degradadoras CR y CB en MMDG.

Los datos de la **Tabla 27** muestran que la concentración de diésel en el medio de cultivo MMDG varía desde 0.91 % hasta 0.42 % con la presencia del consorcio nativo obtenido del suelo contaminado; asimismo, la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo también varía desde 2.33 g/L hasta 0.3 g/L. Esto fue medido por método gravimétrico con diclorometano como solvente, durante los días 0, 2, 4, 8 y 11 a partir de la inoculación.

Tabla 27. Concentración de diésel y glucosa en reactores con presencia de consorcio nativo mixto.

	Concentración de Hidrocarburo (%)	Concentración de Glucosa (g/L)
RD0	0.91	2.33
RD2	0.93	0.25
RD4	0.88	0.54
RD8	0.56	0.76
RD11	0.42	0.3

En la **Figura 27**, la gráfica de tendencia muestra una aparente la variación en cuanto a la concentración de hidrocarburos al día 11 de ensayo; mientras que en cuanto a la tendencia de concentración de glucosa (**Figura 28**), se puede inferir una disminución rápida al día 2, para luego presentar un incremento al día 8, lo cual podría deberse a la intervención en la degradación de una población más lenta pero tolerante al

hidrocarburo o a la generación de metabolitos secundarios por las condiciones de estrés a las que están sometidos los microorganismos del consorcio.

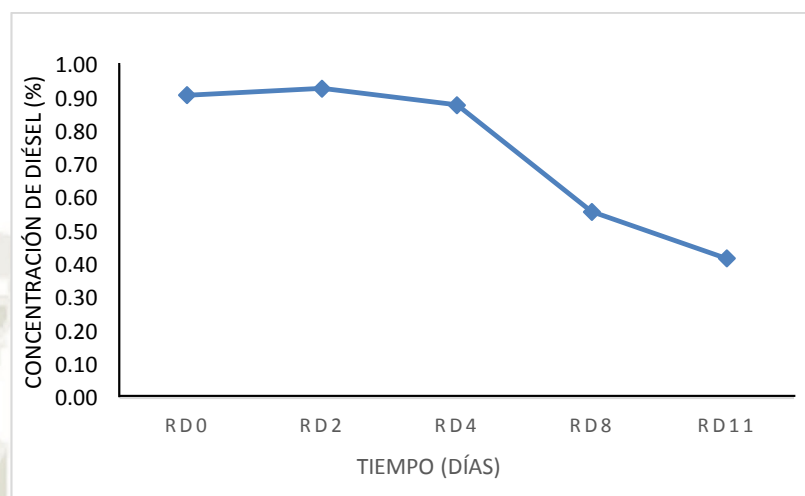


Figura 27. Concentración de diésel en presencia de consorcio nativo mixto con respecto al tiempo de degradación.

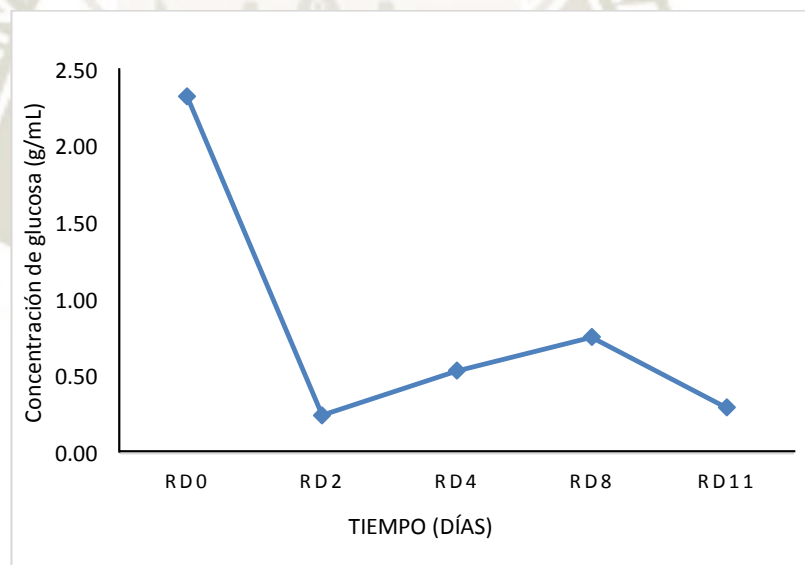


Figura 28. Concentración de glucosa en presencia de consorcio nativo mixto con respecto al tiempo de degradación.

En la **Tabla 28** se muestran los promedios de las mediciones registradas para el blanco y el día 11. Se realizó la prueba t-student para comparar si existió diferencia entre dichas mediciones, evidenciando que para determinaciones de Hidrocarburos (%) y Glucosa (mg/L), se encontró una diferencia estadísticamente significativa al 95% de confianza, con valores-p de 0.0003 y 0.0017, respectivamente. Es válido afirmar que,

estadísticamente, existió un porcentaje de degradación de hidrocarburos en donde las especies presentes en el consorcio mixto se desempeñaron aprovechando la disponibilidad del diésel como sustrato, alcanzando un porcentaje de degradación del 48.78 %, deduciéndose una pérdida previa de hidrocarburos por volatilización de 5.06 %.

Tabla 28. Prueba t-Student para concentración de diésel y glucosa al día 11.

	RDB	RD11	VALOR-P	CONCLUSIÓN
Determinación de concentración de diésel (%)	0.82	0.42	0.0003	Diferencia estadísticamente significativa
Determinación de concentración de glucosa (g/L)	0.426	0.30	0.0017	Diferencia estadísticamente significativa

Otro de los parámetros indicadores de degradación es la variación del pH. En la **Tabla 29** se pueden observar los niveles de pH reportados por día de ensayo en los reactores inoculados con el consorcio mixto y en la **Figura 29** se observa la distribución de los datos en una gráfica de tendencia del pH con respecto al tiempo de ensayo.

Tabla 29. pH del medio de cultivo MMDG en presencia del consorcio nativo mixto.

Día	pH
0	4.78
1	4.61
2	3.74
3	4.32
4	4.08
5	3.85
6	3.57
7	3.41
8	3.47
9	3.59
10	3.63
11	3.63

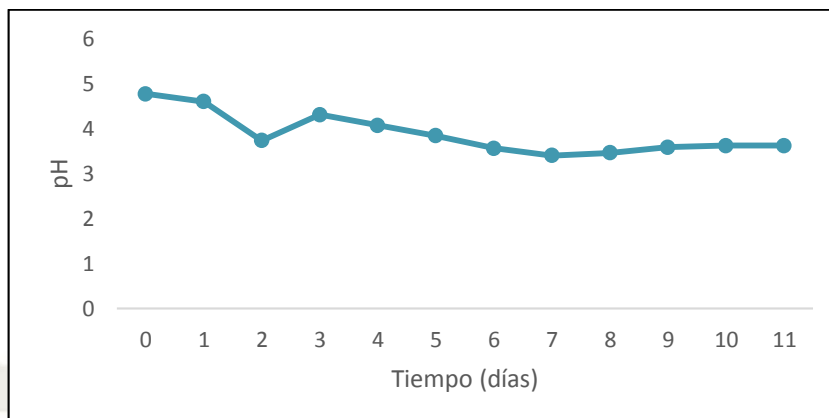


Figura 29. pH del medio de cultivo en presencia de consorcio nativo mixto con respecto al tiempo.

En la **Figura 26**, aparentemente se muestran tres etapas de generación de microorganismos del consorcio nativo, los cuales se producirían en los intervalos de los días 0 a 4; 4 a 8 y 8 a 11. Existen ciertas coincidencias en cuanto a los otros parámetros que también fueron variando conforme estos mismos intervalos de tiempos, por ejemplo, se podría inferir una ligera disminución de la concentración de hidrocarburos en este intervalo debido a los compuestos volátiles presentes en el diésel pues, aunque los ensayos fueron realizados en reactores herméticamente cerrados, su baja solubilidad en el agua provoca que una gran parte de hidrocarburo hidrófobo se presente en forma de emulsión y los componentes volátiles pasan a la fase gaseosa, por lo que dejan de estar disponibles para los microorganismos (79). En esta primera etapa también se manifiesta un descenso abrupto de las concentraciones de glucosa lo que podría deberse a que los microorganismos usan la fuente de carbono más fácil de degradar y disponible en el medio, ya que se trata de un compuesto hidrofílico y soluble.

De acuerdo a la investigación que realizaron Ganesh y Lin en la Universidad de KwaZulu-Natal (Sudáfrica) (114), el incremento de las concentraciones de glucosa en el medio de cultivo líquido, aumenta el grado de degradación del diésel, sustancialmente (114). Otro parámetro importante que se manifiesta en cuanto a tendencia es el pH, el cual tiende disminuir al día 2 del ensayo, para luego volver aumentar su valor en el día 4. La causa de este comportamiento podría ser que debido

a que el consumo de glucosa provoca la liberación de ácidos orgánicos en el medio, lo que produciría una disminución del pH.

La segunda etapa de la tendencia que tiene el crecimiento microbiano (día 4 – 8) coincide con la tendencia del pH a disminuir y a la degradación de diésel, el cual estaría liberando ácidos grasos, contribuyendo con la acidez del medio. Sin embargo; en cuanto a la concentración de glucosa, esta tiende a subir de nuevo lo que podría corresponder a la presencia de algunos microorganismos potótrofos que metabolizan sus propios requerimientos nutricionales en condiciones de estrés (109).

En la última etapa de crecimiento, se manejan datos de pH más estables en el tiempo, mientras que la concentración de diésel se muestra con tendencia a bajar y la de glucosa disminuye nuevamente; es aquí donde se infiere que los microorganismos se han adaptado por completo y reconocen sus funciones metabólicas y mecanismos enzimáticos.

En comparación con las cepas aisladas, los sistemas con presencia del consorcio nativo mixto presentaron menor pérdida de hidrocarburos volátiles, probablemente debido a que se desarrollaron más poblaciones dentro de la comunidad que aprovecharon en degradar las fracciones en simultáneo.

En cuanto a la degradación de hidrocarburos, el consorcio presentó capacidad de degradación del 48.78% de hidrocarburos presentes en el medio, similar a la capacidad de degradación de la cepa R que obtuvo un 51.27%, a comparación de la cepa B que presentó la menor capacidad degradativa con 32.84%.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

1. El suelo muestreado presentó una textura de tipo franco-arcilloso-arenoso, pH neutro, nitrógeno (0.66%), materia orgánica (0.77%) y fósforo (38.21 ppm), los cuales se ajustan a los valores previstos por la proximidad del terreno a suelos de uso agrícola. Las altas concentraciones de lubricantes y combustibles registrados (68597.84 ppm), corresponden a un suelo altamente contaminado, excediendo el valor máximo permitido de 5000 ppm que establecen los Estándares de Calidad Ambiental (ECA's) para suelos de uso industrial.
2. Se logró aislar y caracterizar dos cepas bacterianas acidófilas tolerantes al diésel de petróleo (Cepa CR y cepa CB). La cepa CR se caracterizó por ser coco gram positivo, con desarrollo de colonias redondas, convexas, lisas y de pigmentación rosa en placa; en cuanto a CB, este se trató de un bacilo gram negativo, de colonias redondas, convexas, lisas, cremosas y de pigmentación blanca en placa. A partir de la identificación molecular, se definió que la cepa CR pertenece al grupo taxonómico de los *Micrococcales*; mientras que la cepa CB forma parte del grupo de las *Proteobacterias*.
3. En relación a los parámetros indicadores de actividad degradante de diésel, el crecimiento celular de las cepas CR, CB y del consorcio nativo CN desarrollados en medio de cultivo líquido, presentaron diferencias estadísticamente significativas en las distintas fases evaluadas. Por otro lado, debido a la variación de las concentraciones de glucosa en todos los sistemas, se puede evidenciar el consumo del mismo; no obstante, en el caso del sistema con la cepa R, existe la probabilidad de la generación de metabolitos secundarios que expliquen las fluctuaciones de glucosa, del mismo modo que en el sistema con el consorcio CN. La aplicación del método gravimétrico de extracción por solvente, permitió determinar los porcentajes de biodegradación

de diésel alcanzados por las cepas CR, CB y por el consorcio CN durante 13 días, presentando valores de 51.27 %, 32.84 % y 48.78 %, respectivamente. Tomando en consideración la variación de pH del sistema con presencia del consorcio CN, esta muestra una diferencia estadísticamente significativa comparada con los valores de disminución de pH registrados en los sistemas con presencia de las cepas individuales.





CAPÍTULO V

RECOMENDACIONES

1. Identificar los mecanismos bacterianos que inducen la degradación, determinando si estos se deben a la formación de miscelas o a la hidrofobicidad de la membrana celular de los microorganismos.
2. Determinar la capacidad sintética de biosurfactantes de las especies bacterianas CR y CB, para confirmar su naturaleza protótrofa.
3. Analizar el comportamiento de las cepas aisladas y del consorcio nativo mixto a partir del establecimiento de microcosmos con suelos contaminado.
4. Determinar la viabilidad de la aplicación de tratamientos de bioaumentación en terrarios usando un consorcio nativo definido (CR y CB) y un consorcio nativo.
5. Estudiar la biodiversidad de poblaciones microbianas en diferentes tipos de suelos contaminados con hidrocarburos, abarcando una distribución espacial de las profundidades del muestreo que sea representativa del área.
6. Evaluar el desempeño de microorganismos obtenidos a partir de muestras de sedimentos líquidos contaminados con hidrocarburos provenientes de derrames o actividades industriales.



CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jacobucci D, Vasconcelos C, Jackisch-Matsuura AB, FALCONI F, DURRANT L. Jacobucci, D., Vasconcelos, C., Jackisch-Matsuura, A. B., FALCONI, F., & DURRANT, L. (2001). Degradation of diesel oil by biosurfactant-producing bacterial strains. Degradation of diesel oil by biosurfactant-producing bacterial strains. 2001;
2. Adebisi FM, Adeyemi AF. Characterisation of the petroleum hydrocarbons-contaminated soils around a petroleum products depot. Chem Ecol. 2010;26(2):137-46.
3. PEPDA. Proyecto de eliminación de piscinas y derrames del Distrito Amazónico [Internet]. 2006 [citado 30 de mayo de 2017]. Disponible en: www.proteccionambiental.org
4. Arrieta O, Rivera A, Rojano B, Ruiz O, Correa MM, Cienfuegos A, et al. Caracterización fenotípica y molecular de poblaciones bacterianas aisladas de un suelo contaminado.
5. Diaz Mora CP. Cinética bacteriana de cinco cepas degradadoras de hidrocarburos y su consorcio, en diferentes condiciones de PH y temperatura, a nivel de laboratorio y biofermentador para la producción piloto semindustrial. SANGOLQUÍ/ESPE/2007; 2007.
6. Manahan SE. Introducción a la química ambiental. Editorial Reverté; 2007.
7. Sabroso M, Pastor A. Guía sobre suelos contaminados. Zaragoza CEPYME Aragon y Gob Aragón. 2004;
8. Das BM, Sivakugan N. Fundamentals of geotechnical engineering. Cengage Learning; 2016.

9. Del Valle Soria F. Química del Carbono: Introducción al universo de los hidrocarburos. 2009.
10. Higgins IJ, Burns RG. The Chemistry and Microbiology of Pollution. Academic Press.; 1978.
11. Rittmann BE, Seagren E, Wrenn BA. In situ bioremediation. Taylor & Francis; 1994.
12. Balba MT, Al-Awadhi N, Al-Daher R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. J Microbiol Methods. 1998;32(2):155-64.
13. Instituto Mexicano del Petróleo [Internet]. [citado 26 de junio de 2018]. Disponible en: <https://www.gob.mx/imp>
14. Prince RC. Petroleum and other hydrocarbons, biodegradation of. Encycl Environ Microbiol. 2003;
15. Olson JJ, Mills GL, Herbert BE, Morris PJ. Biodegradation rates of separated diesel components. Environ Toxicol Chem. 1999;18(11):2448-53.
16. Gieg LM, Kolhatkar R V, McInerney MJ, Tanner RS, Harris SH, Sublette KL, et al. Intrinsic bioremediation of petroleum hydrocarbons in a gas condensate-contaminated aquifer. Environ Sci Technol. 1999;33(15):2550-60.
17. Wrenn BA, Venosa AD. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. Can J Microbiol. 1996;42(3):252-8.
18. Burland SM, Edwards EA. Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. Appl Environ Microbiol. 1999;65(2):529-33.
19. Pothuluri J V, Cerniglia CE. Current aspects on polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation processes. Bioremediation Princ Pract. 1998;1:461-520.
20. Antonio Zárate Y. Evaluación del impacto de la contaminación con diésel en

- las propiedades mecánicas de un suelo arcilloso. 2014. p. 122.
21. Hanson KG, Nigam A, Kapadia M, Desai AJ. News & Notes: Bioremediation of crude oil contamination with *Acinetobacter* sp. A3. *Curr Microbiol.* 1997;35(3):191-3.
 22. Doménech X. *Química del suelo: El impacto de los contaminantes.* Miraguano; 1995.
 23. Carlson C. Influences of sorption on microbial degradation of organic substances. *Internet Doc Univ Lund.* 1996;
 24. Weber Jr WJ, Young TM, Killers A. Microscale heterogeneities in soil properties and their effects on contaminant sorption and bioavailability. En: *Fundamentals and Applications of Bioremediation: Principles.* CRC Press; 1997. p. 221.
 25. Cassidy D, Irvine RL. Interactions between organic contaminants and soil affecting bioavailability. En: *Fundamentals and Applications of Bioremediation: Principles.* CRC Press; 1997. p. 259.
 26. MdC GC, Zavala C. Rasgos hidromórficos de suelos tropicales contaminados con hidrocarburos. 2002 [citado 26 de junio de 2018];20(2):101-11. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57320202>
 27. Martínez, Víctor E.; López S. M y F. Efecto De Hidrocarburos En Las Propiedades Físicas Y Químicas De Suelo Arcilloso. *Terra Latinoam* [Internet]. 2001;9-17. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/573/57319102.pdf>
 28. Pala DM, de Carvalho Freire DD, Anna Jr GLS. Bioremediation of clay soils impacted by petroleum. *Rev Eng Térmica.* 2002;1(2).
 29. Okpokwasili GC, Amanchukwu SC. Petroleum hydrocarbon degradation by *Candida* species. *Environ Int.* 1988;14(3):243-7.
 30. Venosa AD, Stephen JR, Macnaughton SJ, Chang Y, White DC. Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill. *Appl*

- Environ Microbiol. 1999;65(8):3566-74.
31. Troquet J, Troquet M. Les méthodes de dépollution des sols contaminés par les hydrocarbures. Environ Eng Consult. 2003;
 32. Xu Y, Lu M. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. J Hazard Mater. 2010;183(1-3):395-401.
 33. Thomassin-Lacroix E, Eriksson M, Reimer K, Mohn W. Biostimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. Appl Microbiol Biotechnol. 2002;59(4-5):551-6.
 34. Timmis KN, Pieper DH. Bacteria designed for bioremediation. Trends Biotechnol. 1999;17(5):201-4.
 35. Durán Rincón M, Contreras N. Alternativa de tratamiento para tierras fuller contaminadas con aceite dieléctrico. Sci Tech. 2006;12(32).
 36. Frutos FJG, Escolano O, García S, Babín M, Fernández MD. Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene-contaminated soil. J Hazard Mater. 2010;183(1-3):806-13.
 37. Taccari M, Milanovic V, Comitini F, Casucci C, Ciani M. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. Int Biodeterior Biodegradation. 2012;66(1):39-46.
 38. Lin T-C, Pan P-T, Cheng S-S. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. J Hazard Mater. 2010;176(1-3):27-34.
 39. Antizar-Ladislao B, Beck AJ, Spanova K, Lopez-Real J, Russell NJ. The influence of different temperature programmes on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a coal-tar contaminated soil by in-vessel composting. J Hazard Mater. 2007;144(1-2):340-7.
 40. Robles-González I, Rios-Leal E, Ferrera-Cerrato R, Esparza-Garcia F, Rinderkenecht-Seijas N, Poggi-Varaldo HM. Bioremediation of a mineral soil

- with high contents of clay and organic matter contaminated with herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid using slurry bioreactors: effect of electron acceptor and supplementation with an organic carbon source. *Process Biochem.* 2006;41(9):1951-60.
41. Ríos Vásquez R. Estudio de la estimulación biológica para el tratamiento de residuos de perforación petrolera empleando lisímetros. Univ Autónoma Metrop Unidad Iztapalapa Casa Abierta al Tiempo México DF. 2005;
 42. Alexander M. *Introduction to soil microbiology.* 1961;
 43. Eweis JB, Ergas SJ, Chang DPY, Schroeder ED. *Bioremediation principles.* McGraw-Hill Book Company Europe; 1998.
 44. Prince RC, Varadaraj R, Fiocco RJ, Lessard RR. Bioremediation as an oil spill response tool. *Environ Technol.* 1999;20(8):891-6.
 45. Rittmann BE, de Roda G. *Biotecnología del medio ambiente: Principios y aplicaciones.* 2001.
 46. Alexander M. *Introduction to soil microbiology.* Segunda. John Wiley and Sons; 1991.
 47. Atlas RM, Bartha R. *Ecología microbiana y microbiología ambiental.* 4ta Ed. Madrid: Pearson-Addison Wesley; 2002.
 48. Vazques-Duhalt R. Environmental oil biocatalysis. En: *Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocesses.* CRC Press; 1999. p. 191.
 49. Valderrama Blanco B. *Microbiología del petróleo y sus derivados* [Internet]. [citado 26 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap2/>
 50. Colwell RR, Walker JD, Cooney JJ. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *CRC Crit Rev Microbiol.* 1977;5(4):423-45.
 51. Atlas R, Bragg J. *Bioremediation of marine oil spills: when and when not—the*

- Exxon Valdez experience. *Microb Biotechnol.* 2009;2(2):213-21.
52. Amund OO, Nwokoye N. Hydrocarbon degradation potentials of yeast isolates from a polluted lagoon. 1993;
 53. Perry JJ. Microbial metabolism of cyclic alkanes. 1984;
 54. Davis SJ, Gibbs CF. The effect of weathering on a crude oil residue exposed at sea. *Water Res.* 1975;9(3):275-85.
 55. Singer ME, Finnerty WR. Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. 1984;
 56. Boethling RS, Alexander M. Effect of concentration of organic chemicals on their biodegradation by natural microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 1979;37(6):1211-6.
 57. Thomas JM, Yordy JR, Amador JA, Alexander M. Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. *Appl Environ Microbiol.* 1986;52(2):290-6.
 58. Yoshida F, Yamane T. Hydrocarbon uptake by microorganisms—a supplementary study. *Biotechnol Bioeng.* 1971;13(5):691-5.
 59. Fogel S, Lancione R, Sewall A, Boethling RS. Application of biodegradability screening tests to insoluble chemicals: hexadecane. *Chemosphere.* 1985;14(3-4):375-82.
 60. Bartha R, Bossert I. The treatment and disposal of petroleum wastes. 1984;
 61. Cooney JJ. The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems. 1984;
 62. Choi SC, Kwon KK, Sohn JH, Kim SJ. Evaluation of fertilizer additions to stimulate oil biodegradation in sand seashore mesocosms. *J Microbiol Biotechnol.* 2002;12(3):431-6.
 63. Kim S-J, Choi DH, Sim DS, Oh Y-S. Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand. *Chemosphere.* 2005;59(6):845-

- 52.
64. Chaineau CH, Rougeux G, Yepremian C, Oudot J. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil Biol Biochem.* 2005;37(8):1490-7.
 65. Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int.* 2011;2011.
 66. G Jones J, Knight M, A Byrom J. Effect of Gross Pollution by Kerosine Hydrocarbons on the Microflora of a Moorland Soil. Vol. 227, *Nature.* 1970. 1166 p.
 67. Zobell CE. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol Rev.* 1946;10(1-2):1.
 68. Verstraete WR, Vanlooche R, DeBorger R, Verlinda A. Modelling of the breakdown and the mobilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers. En: *Proceedings of the 3rd International Biodegradation Symposium London Applied Science Publishers.* 1976. p. 98-112.
 69. Fritsche W, Hofrichter M. Aerobic degradation by microorganisms. *Biotechnol Set, Second Ed.* 2008;144-67.
 70. Hommel RK. Formation and phylogenetic role of biosurfactants. *J Appl Microbiol.* 1990;89(1):119-58.
 71. Fritsche W, Hofrichter M. Aerobic degradation by microorganisms. *Biotechnol Set, Second Ed.* 2008;144-67.
 72. Van Beilen JB, Funhoff EG. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;74(1):13-21.
 73. Zimmer T, Ohkuma M, Ohta A, Takagi M, Schunck W-H. The CYP52 Multigene Family of *Candida maltosa* Encodes Functionally Diverse Alkane-Inducible Cytochromes P450. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;224(3):784-9.

74. International Organization for Standardization. ISO 10381-6:2009. Soil quality. Sampling Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory. [Internet]. [citado 21 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/43691.html>
75. Ministerio del Ambiente. Guía para el muestreo de suelos [Internet]. 2014 [citado 10 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.minam.gob.pe/calidadambiental/wp-content/uploads/sites/22/2013/10/GUIA-PARA-EL-MUESTREO-DE-SUELOS-final.pdf>
76. García A, Ordoñez D. Aislamiento y caracterización de bacterias no filamentosas con capacidad degradadora de plaguicidas a partir de suelo superficial (*Oryza sativa* L.). Pontificia Universidad Javeriana; 2003.
77. Pérez Silva RM, Camacho Pozo MI, Gómez Montes de Oca JM, Ábalos Rodríguez A, Viñas M, Cantero Moreno D. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Rev CENIC Ciencias Biológicas*. 2008;39(1):44-51.
78. Hamaki T, Suzuki M, Fudou R, Jojima Y, Kajiura T, Tabuchi A, et al. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *J Biosci Bioeng*. 2005;99(5):485-92.
79. Braibant Wayens C. Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados. Instituto Tecnológico de Costa Rica; 2004.
80. Lang FS, Destain J, Delvigne F, Druart P, Ongena M, Thonart P. Characterization and evaluation of the potential of a diesel-degrading bacterial consortium isolated from fresh mangrove sediment. *Water, Air, Soil Pollut*. 2016;227(2):58.
81. Universidad de Sevilla - Facultad de Farmacia. Microbiología Clínica: Medios

- de Cultivo [Internet]. 2012 [citado 26 de marzo de 2018]. Disponible en:
<http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/12/medios-de-cultivo.pdf>
82. Universidad de Sevilla. Microbiología Clínica - Medios de Cultivo [Internet]. 2013. Disponible en:
<http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/12/medios-de-cultivo.pdf>
83. United States Environmental Protection Agency. Method 3540C - Soxhlet Extraction. 1996.
84. Elitech. Glucose PAP SL. 2012.
85. United States Environmental Protection Agency. Method 9045D - Soil and Waste pH. 2004.
86. González-Naranjo V, Leal M, Lillo J, De Bustamante I, Palacios-Díaz M del P. Guía de caracterización edáfica para actividades de regeneración de aguas residuales en usos ambientales. 2012.
87. García MG, Infante C, López L. Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferente textura con y sin agente estructurante. *Bioagro*. 2012;24(2):93-102.
88. Kristensen AH, Henriksen K, Mortensen L, Scow KM, Moldrup P. Soil Physical Constraints on Intrinsic Biodegradation of Petroleum Vapors in a Layered Subsurface. *Vadose Zo J* [Internet]. 2010 [citado 1 de agosto de 2018];9(1):137. Disponible en:
<https://www.soils.org/publications/vzj/abstracts/9/1/137>
89. Santos Jallath JE. Caracterización de suelos contamiados con hidrocarburos en una empresa minera y desarrollo de un método biológico para su remediación. Universidad Nacional Autónoma De México; 2007.
90. Hernández-Acosta E, del Carmen Gutiérrez-Castorena M, Rubiños-Panta JE, Alvarado-López J. Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos. *Terra Latinoam*. 2006;24(4):463-70.
91. Alexander M. Biodegradation and bioremediation. Gulf Professional

- Publishing; 1999.
92. Tahir H, Mushtaque Z. Assistentment of soil samples after the disaster of tasman spirit near the clifton beach karachi, pakistan. Electron J Environ Agric Food Chem EJEAFChE. 2005;4(6):1094-101.
 93. Ellis R, Adams RS. Contamination of soils by petroleum hydrocarbons. Department of Agronomy, Kansas State University, Manhattan. En: Soil Sci Soc Am Proc 26. 1960. p. 197-216.
 94. Plice MJ. Some effects of crude petroleum on soil fertility. Soil Sci Soc Am J. 1949;13(C):413-6.
 95. Page AL, Miller RH, Keeney DR. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Agronomy, No. 9. Soil Sci Soc Am Madison, WI. 1982;1159.
 96. Jiménez PG-S, Marotta JIL, Criado SR, García MN. Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España. Parte 1. 2010;
 97. Ministerio del Ambiente P. Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo [Internet]. El Peruano. 2017 [citado 29 de julio de 2018]. Disponible en: http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/12/DS_011-2017-MINAM.pdf
 98. León N, Infante C, Arias M, Márquez M, Gorrín A, McMillen SJ, et al. Biodegradability of Venezuelan crude oils. En: SPE International conference on health, safety, and environment in oil and gas exploration and production. Society of Petroleum Engineers; 1998.
 99. Ujowundu CO, Kalu FN, Nwaoguikpe RN, Kalu OI, Ihejirika CE, Nwosunjoku EC, et al. Biochemical and physical characterization of diesel petroleum contaminated soil in southeastern Nigeria. Res J Chem Sci. 2011;2231:606X.
 100. Criste A, Henț T, Giuburuncă M, Zăhan M, Niste M, FIT N, et al. Characterization of Microorganisms Isolated from Petroleum Hydrocarbon Polluted Soil. Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca Anim Sci Biotechnol.

2016;73(1).

101. Arnáiz C, Laura I, Lebrato J. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. *Tecnol del agua* [Internet]. 2000 [citado 9 de agosto de 2018];205:45-52. Disponible en: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/tvolke/00_Determin-BM.pdf
102. Nápoles J, Abalos A, Marañón A, Aguilera I, Cumbá F. Caracterización de Suelos de la Refinería" Hermanos Díaz. *Rev CENIC Ciencias Químicas*. 2005;36.
103. Harms H, Bosma TNP. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1997;18(2-3):97-105.
104. Paria S. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. abril de 2008 [citado 13 de agosto de 2018];138(1):24-58. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868607001820>
105. Chrzanowski L, Kaczorek E, Pijanowska A, Olszanowski A. The relation between rhamnolipid adsorption on yeast and bacterial strains, hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation. *Fresenius Environ Bull*. 2006;15(7):682-6.
106. Mohanty G, Mukherji S. Effect of an emulsifying surfactant on diesel degradation by cultures exhibiting inducible cell surface hydrophobicity. *J Chem Technol Biotechnol Int Res Process Environ Clean Technol*. 2007;82(11):1004-11.
107. Wyrwas B, Chrzanowski Ł, Ławniczak Ł, Szulc A, Cyplik P, Białas W, et al. Utilization of Triton X-100 and polyethylene glycols during surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel. *J Hazard Mater*. 2011;197:97-103.
108. Bushnell LD, Haas HF. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *J Bacteriol*. 1941;41(5):653.
109. Klug WS, Cummings MR. *Conceptos de genética: Décima edición*. Pearson Educación,; 2013.

110. Miller GT. *Living in the Environment: Principles, Connections, and Solutions*, Brooks. Cole Publishing Company, Pacific Grove; 2000.
111. Islam TH, Ghosh B, Magnet MMH, Fatema K, Akter S, Khan AR, et al. Isolation and identification of petroleum degrading bacteria from oil contaminated soil & water and assessment of their potentiality in bioremediation. *IOSR J Env Sci, Tox Food Techn.* 2013;5(2):55-8.
112. Yetty E, Thontowi A. Polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from the Indonesian Marine Environment. *Biodiversitas, J Biol Divers* [Internet]. 2016;17(2):857-64. Disponible en: <http://biodiversitas.mipa.uns.ac.id/D/D1702/D170263.pdf>
113. Allen CCR, Boyd DR, Hempenstall F, Larkin MJ, Sharma ND. Contrasting effects of a nonionic surfactant on the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons to cis-dihydrodiols by soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(3):1335-9.
114. Ganesh A, Lin J. Diesel degradation and biosurfactant production by Gram-positive isolates. *African J Biotechnol.* 2009;8(21).
115. Gargouri B, Mhiri N, Karray F, Aloui F, Sayadi S. Isolation and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Yeast Strains from Petroleum Contaminated Industrial Wastewater. *Biomed Res Int* [Internet]. 3 de agosto de 2015;2015:929424. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4538589/>
116. Pérez-Leblic MI, Rodríguez J, Turmero A, Hernández M, Blánquez A, Pastor J, et al. Estudio de la diversidad microbiana en suelos de vertederos de residuos sólidos urbanos. En: Ana Jesús Hernández, Carmen Bartolomé, editores. *Estudio multidisciplinar de vertederos sellados Caracterización y pautas de recuperación* [Internet]. 1era Edici. Madrid: Universidad de Alcalá; 2010 [citado 13 de junio de 2018]. p. 97-108. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/73283/1/VRTEDEROS201097189.pdf>

CAPÍTULO VII

ANEXOS

Anexo 7.1 Composición de los medios de cultivo

a) Medio Mineral Líquido (MML)		Diésel		1 %	
Componente	Cantidad	Tritón X-100 (1:1)		0.01 %	
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.1 g/L				
KH ₂ PO ₄	3.0 g/L				
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0 g/L				
NaCl	2.0 g/L				
Tween 80	0.2 g/L				
b) MML suplementado con Glucosa (MMG)		d) Agar Medio Mineral suplementado con Glucosa (AMG)			
Componente	Cantidad	Componente		Cantidad	
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.1 g/L	MgSO ₄ * 7H ₂ O		0.1 g/L	
KH ₂ PO ₄	3.0 g/L	KH ₂ PO ₄		3.0 g/L	
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0 g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄		3.0 g/L	
NaCl	2.0 g/L	NaCl		2.0 g/L	
Tween 80	0.2 g/L	Tween 80		0.2 g/L	
Glucosa	2 g/L	Glucosa		0.2 %	
		Agar		1.5 %	
c) MML suplementado con Glucosa y Diésel (MMDG)		e) Agar Medio Mineral suplementado con Glucosa y Diésel (AMDG)			
Componente	Cantidad	Componente		Cantidad	
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.1 g/L	MgSO ₄ * 7H ₂ O		0.1 g/L	
KH ₂ PO ₄	3.0 g/L	KH ₂ PO ₄		3.0 g/L	
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0 g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄		3.0 g/L	
NaCl	2.0 g/L	NaCl		2.0 g/L	
Tween 80	0.2 g/L	Tween 80		0.2 g/L	
Glucosa	2 g/L	Glucosa		0.2 %	
		Diésel		1%	
		Tritón X-100 (1:1)		0.01 %	
		Agar		1.5 %	

Anexo 7.2: Sitio de muestreo



A) Punto de muestreo en taller de mantenimiento mecánico de empresa de transportes de buses interprovinciales. B) Surtidor de combustible Diésel 2.

Anexo 7.3: Procesamiento de muestra



A) Subgrupos de muestras. B) Muestra general tamizada y homogeneizada.

Anexo 7.4: Informe de ensayos de caracterización fisicoquímica.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y FORMALES
Unidad de Producción de Bienes y Prestación de Servicios
Laboratorio SERVILAB



INFORME DE ENSAYO

N° DE REPORTE: 16692-16

DETERMINACIÓN DE:					
pH		7,25			
Nitrógeno	%	0,08			
Materia orgánica	%	0,77			
Fósforo total	ppm	38,21			
Lubricantes y combustibles	ppm	68597,84			
Conductividad	mS/cm	5,23			

OBSERVACIONES

METODO DE ENSAYO	
DETERMINACIÓN	METODO DE ENSAYO APLICADO NORMA /REFERENCIA / NOMBRE
pH	Método pH Métrico
Nitrógeno	Método 2.057 de la AOAC.
Carbono	Método Walkley Black
Materia orgánica	Método Walkley Black
Fósforo total	Método Colorimétrico de la AWWA
Lubricantes y combustibles	Método de Extracción por Solventes
Conductividad	Método Potenciométrico.

Estadío en Arequipa (Perú), el 10 de Mayo del 2016

PAGINA 2 DE 1

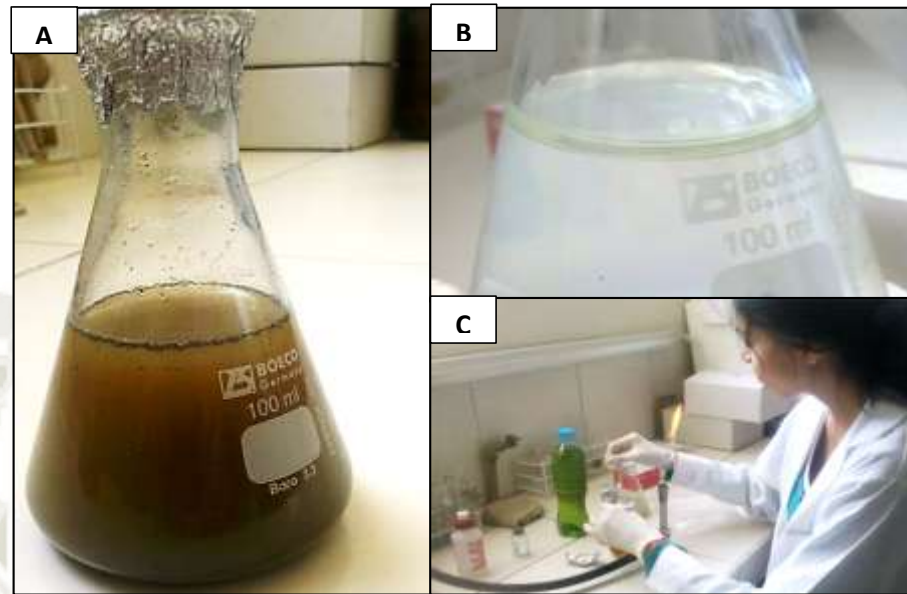
Dr. Juan Reyes Larico
Jefe de Laboratorio
RCQP - 348



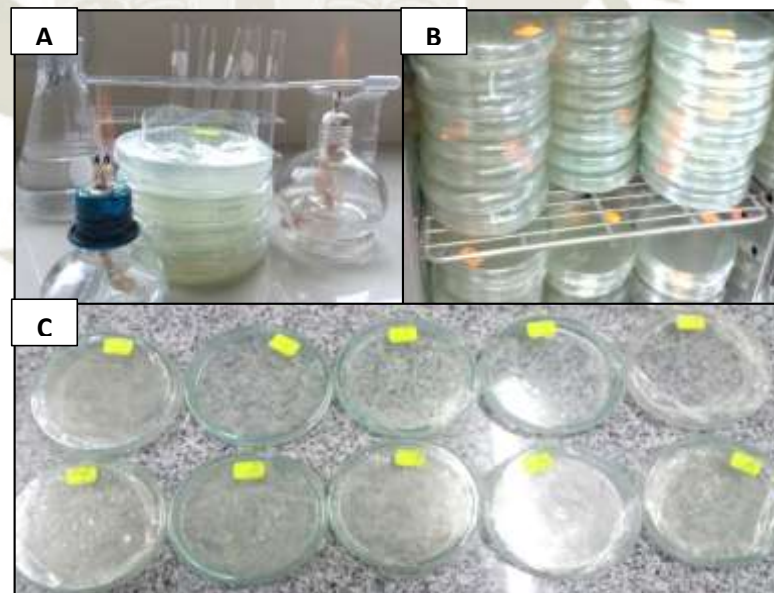
Fredy Valdivia Peña
Lic. Fredy Valdivia Peña
Químico Responsable
RCQP - 842

SERVILAB
SERVICIOS QUÍMICOS EN GENERAL
Pabellón MARIANO E. DE RIVERO Y USTARIZ (QUÍMICA)
Av. Independencia s/n - Ciudad Universitaria - Laboratorio 108 (Primer Piso)
Teléfono (954) 220360 e-mail: upbs.servilab@hotmail.com
Arequipa - Perú

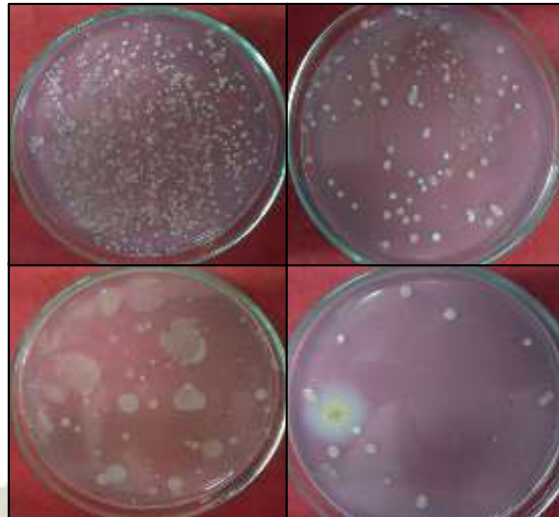
Anexo 7.5: Obtención de microorganismos.



A) Cultivo de pre-enriquecimiento en medio BHI. B) Medio Mineral Líquido suplementado con Diesel y Glucosa. C) Procedimiento de inoculación en medio de cultivo estéril.



A) Diluciones seriadas B) Placas en incubación con siembras de diluciones de suelo C) Post-incubación de cultivos para recuento

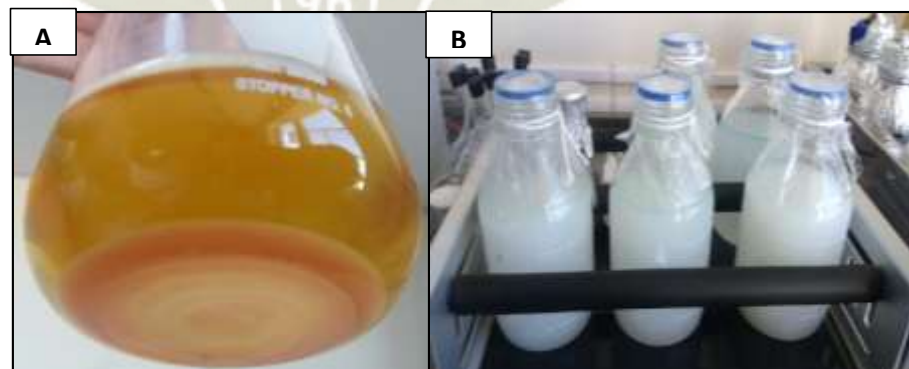


Siembra de microorganismos nativos de suelo en medio de cultivo nutritivo para crecimiento general y recuento en placa

Anexo 7.6: Establecimiento de sistemas de reactores.

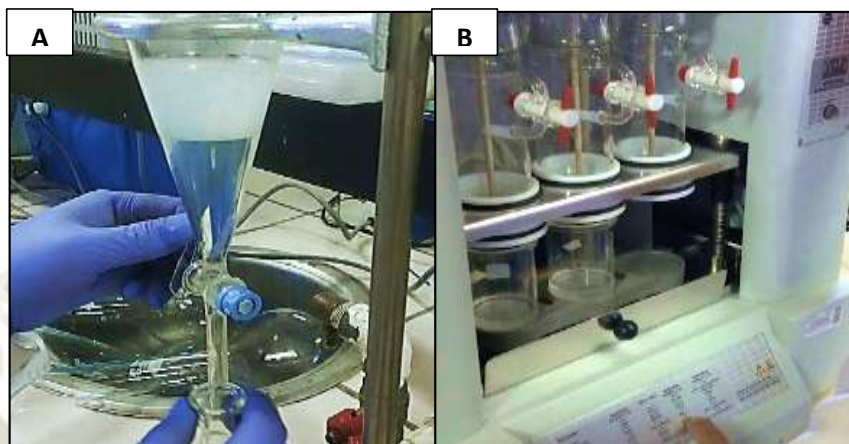


A) Reactores provistos de Medio Mineral Líquido estéril. B) Reactores con Medio Mineral Líquido suplementados con Diesel (1%).

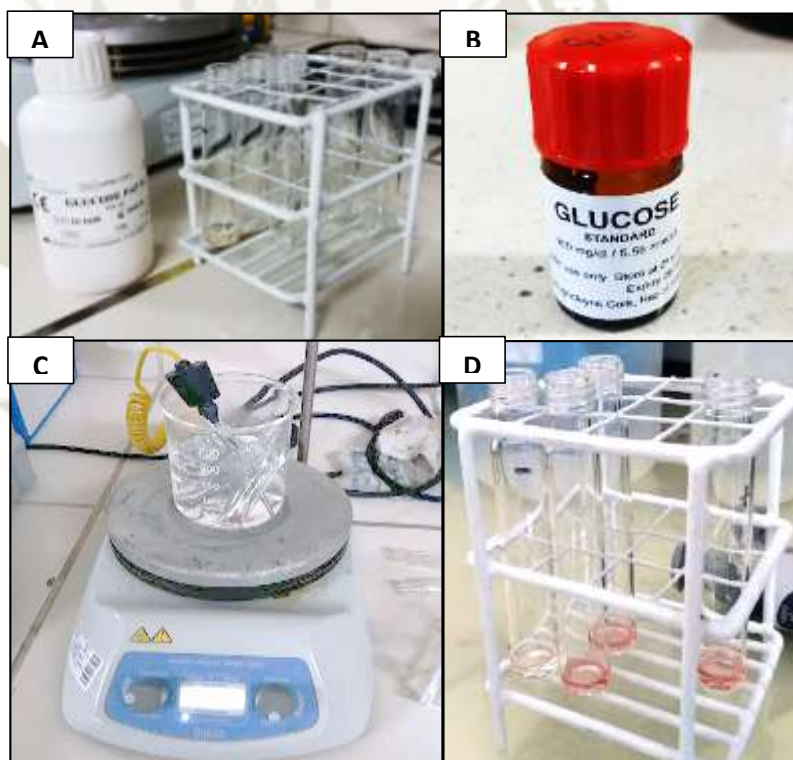


A) Cultivo con cepa rosada (cepa R). B) Reactores inoculados en agitador orbital.

Anexo 7.7: Ensayos para determinación de parámetros de actividad biodegradativa



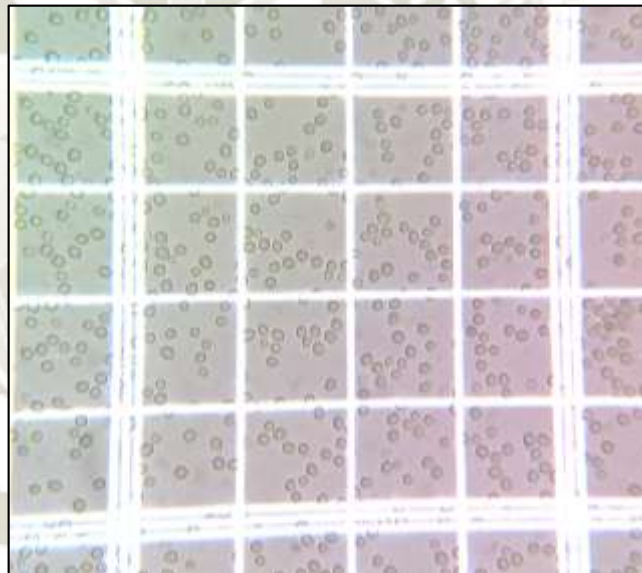
A) Agitación en peras de decantación. B) Extracción por solvente orgánico (Diclorometano) en Soxhlet automático



A) Reactivo R y muestras en tubos de ensayo por triplicado. B) Estándar Std D-Glucosa. C) Baño María a 37 °C con tubos de ensayo de muestras y blanco.



Potenciómetro digital para reporte de pH.



Vista al microscopio de muestra de Medio Mineral Líquido suplementado con hidrocarburo Diésel para conteo de Cepa R en cámara de Neubauer.

Anexo 7.8 Gráficos estadísticos de crecimiento microbiano de consorcios y aislados

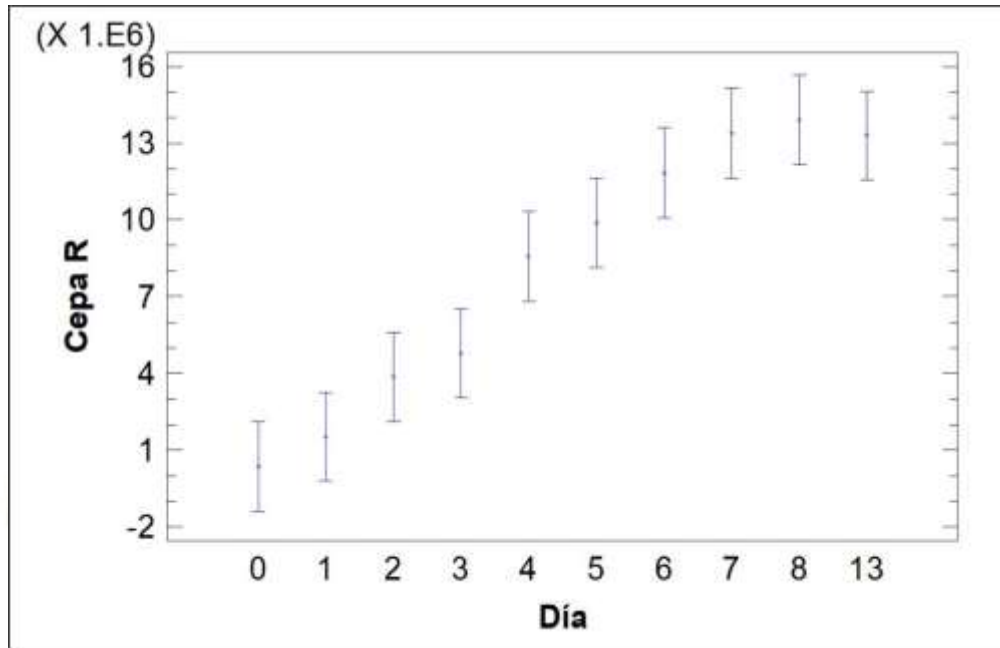


Figura A-3. Concentración de microorganismos en medio de cultivo para cepa R

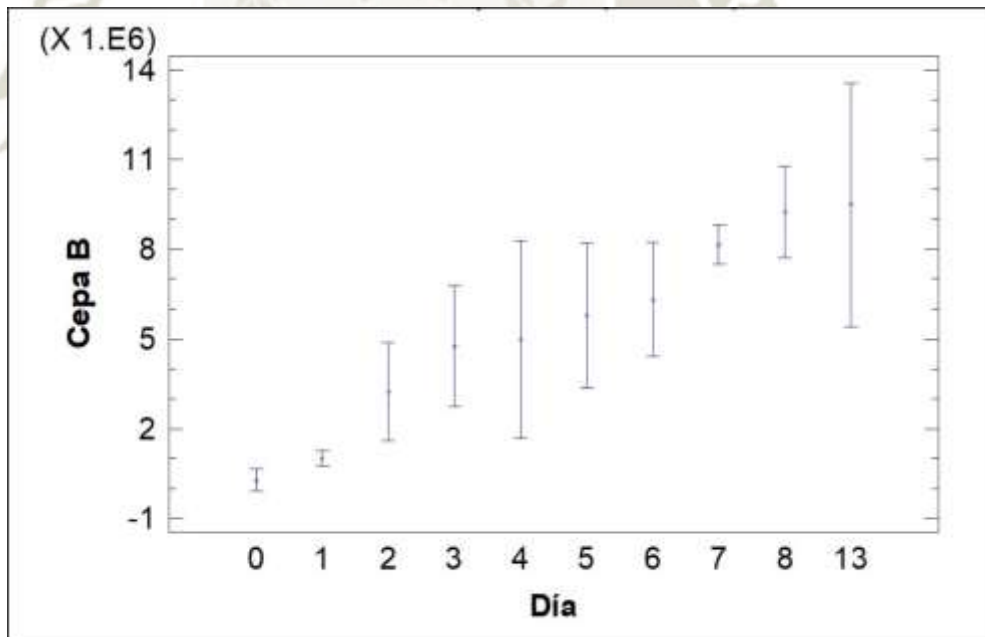


Figura A-4. Concentración de microorganismos en medio de cultivo para cepa B

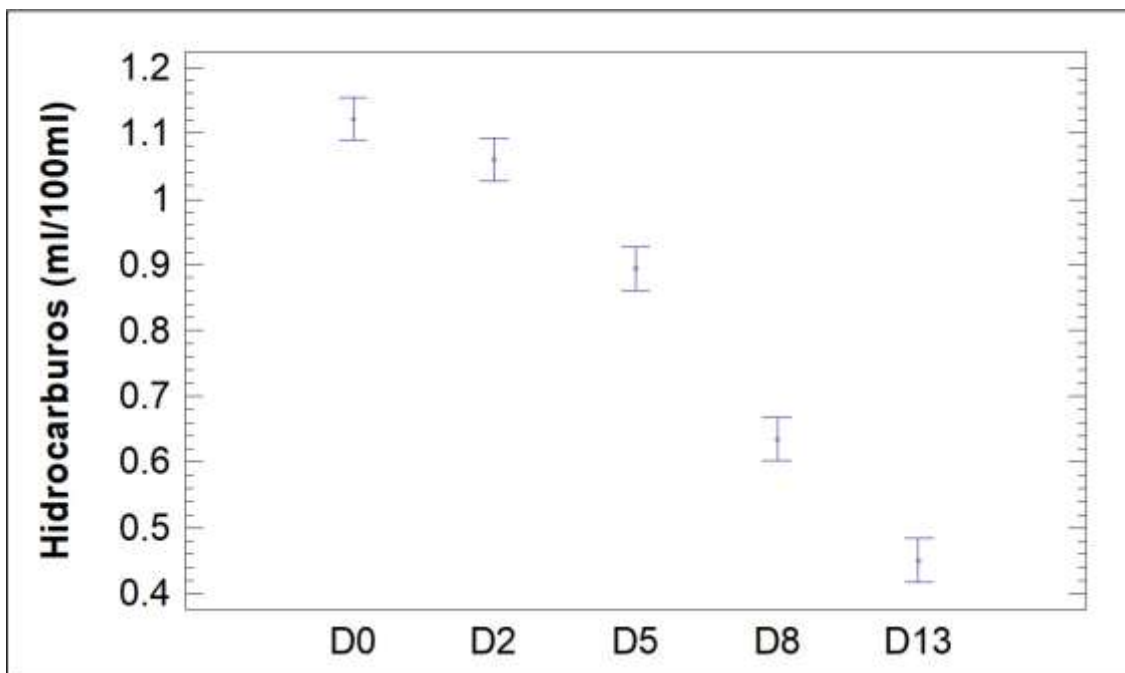


Figura A-1. Concentración de hidrocarburo en medio de cultivo para cepa R

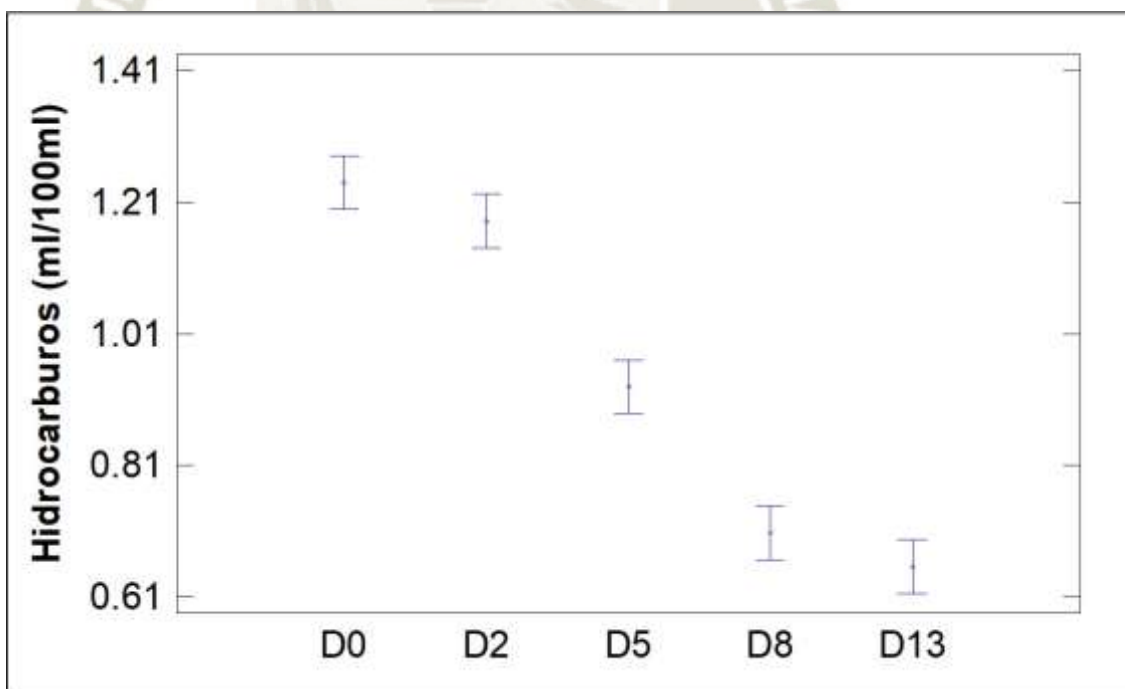


Figura A-2. Concentración de hidrocarburo en medio de cultivo para cepa B

Anexo 7.8 Datos de ensayos de degradación de glucosa para CR, CB, CN en MMDG

CEPA ROSADA (CR)						
CONCENTRACIÓN		DÍA				
		0	2	5	8	13
Estándar (St)		2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
1		2.358714	2.203049	1.597169	2.246967	2.057565
2		2.593344	1.955644	1.687969	2.474355	2.312221
3		2.443316	2.288129	1.700489	2.082453	2.649128
Promedio		2.46512467	2.14894067	1.66187567	2.267925	2.339638

CEPA BLANCA (CB)						
CONCENTRACIÓN		DÍA				
		0	2	5	8	13
Estándar (St)		2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
1		2.292977	1.679323	1.203	0.746	0.457
2		2.181443	1.513918	1.355	1.074	0.712
3		2.300484	1.385956	1.288	0.821	0.649
Promedio		2.25830133	1.526399	1.282	0.88033333	0.606

CONSORCIO NATIVO (CN)						
CONCENTRACIÓN		DÍA				
		0	2	5	8	13
Estándar (St)		2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
1		2.312977	0.279323	0.293	0.712	0.457
2		2.351443	0.2513918	0.59	0.795	0.292
3		2.300484	0.265956	0.58	0.725	0.315
Promedio		2.33	0.25	0.54	0.746	0.3