

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

UNIDAD DE POST GRADO

**Biodegradación bacteriana por bioestimulación en
suelos contaminados con petróleo crudo**

TESIS

para optar el grado académico de Magíster en Biotecnología

AUTORA

Elizabet Samanez Gibaja

ASESOR

Fernando Merino Rafael

Lima – Perú

2008

*A mi querida madre Aydee,
por haberme guiado con esfuerzo,
inteligencia y amor
durante toda mi vida.*

*A la memoria de mi querido
padre David, por haber guiado
mis pasos con amor.*

*A mis hermanos, por su
invalorable apoyo.*

*A mi esposo Carlos, por su
apoyo y cariño incondicional.*

A Mariela, por su valiosa amistad.

ELIZABET

AGRADECIMIENTOS

1. Al Mg. Fernando Merino Rafael, por su dedicación, apoyo invaluable y empeño en la realización del presente trabajo de investigación.
2. A la Mg. Susana Gutiérrez, por su constante ayuda.
3. A la Mg. Enma Cambillo, por su apoyo incondicional en la asesoría estadística.
4. A la Blga. Mariela Villarrubia, por su constante ayuda para el desarrollo y culminación del estudio.

ÍNDICE GENERAL

| | Pg. |
|---|-----------|
| RESUMEN..... | 6 |
| ABSTRACT..... | 7 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 11 |
| 3 . MATERIALES Y MÉTODOS..... | 17 |
| 3.1. MATERIALES..... | 18 |
| 3.2. MÉTODOS..... | 18 |
| 3.2.1. MUESTREO | |
| 3.2.1.1. DE SUELOS PARA AISLAMIENTO DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS..... | 18 |
| 3.2.1.2. DE SUELOS PARA EVALUAR LA BIODEGRADACIÓN DEL PETROLEO CRUDO..... | 18 |
| 3.2.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS | |
| 3.2.2.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS DEGRADADORAS DEL PETROLEO..... | 19 |
| 3.2.2.2. ACTIVIDAD EMULSIFICANTE DE LAS BACTERIAS DEGRADADORAS DE PETROLEO..... | 20 |
| 3.2.2.3. ACTIVIDAD DEGRADATIVA DE LAS CEPAS BACTERIANAS..... | 20 |
| 3.2.2.4. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA..... | 21 |
| 3.2.2.5. SELECCIÓN DEL CONSORCIO BACTERIANO NATIVO..... | 21 |
| 3.2.2.6. PREPARACIÓN DE INOCULO..... | 21 |
| 3.2.2.7. RECUENTO DE BACTERIAS MESÓFILAS | 22 |
| 3.2.2.8. RECUENTO DE BACTERIAS OLEOFÍLICAS..... | 22 |
| 3.2.2.9. PREPARACIÓN DE LOS TERRARIOS | 23 |
| 3.2.2.10. CARACTERIZACIÓN DEL SUELO DE CULTIVO..... | 24 |
| 3.2.2.11. MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA DE LOS SUELOS DE CULTIVO | 24 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.2.2.12. | BIODEGRADACIÓN DEL CRUDO DE PETROLEO EN TERRARIOS..... | 25 |
| 3.2.2.13. | COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CRUDO..... | 25 |
| 3.2.2.14. | FORMULACIÓN DE LOS FERTILIZANTES INORGÁNICOS..... | 26 |
| 3.2.2.15. | CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES..... | 26 |
| 3.2.2.16. | ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 27 |
| 4. | RESULTADOS..... | 28 |
| 4.1. | AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS..... | 28 |
| 4.2. | IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA | 29 |
| 4.3. | ACTIVIDAD EMULSIFICANTE DE LAS BACTERIAS DEGRADADORAS DEL PETROLEO..... | 29 |
| 4.4. | ACTIVIDAD DEGRADATIVA DE LAS CEPAS BACTERIANAS..... | 31 |
| 4.5. | SELECCIÓN DEL CONSORCIO BACTERIANO..... | 32 |
| 4.6. | BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS..... | 33 |
| 4.7. | ANALISIS DE SUELOS..... | 35 |
| 4.8. | ANÁLISIS DEL CRUDO DE PETRÓLEO..... | 40 |
| 4.9. | ANÁLISIS ESTADISTICO..... | 41 |
| 5. | DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 63 |
| 6. | CONCLUSIONES..... | 67 |
| 7. | RECOMENDACIONES..... | 68 |
| 8. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 69 |
| 9. | ANEXOS | 75 |

RESUMEN

El problema de la contaminación ambiental con petróleo es de vital importancia, ya que causa efectos perjudiciales en los ecosistemas terrestres y acuáticos.

La biodegradación de hidrocarburos en suelos, es una alternativa para el tratamiento de la contaminación con petróleo.

En el presente estudio se ha evaluado la capacidad degradadora de bacterias, frente a los hidrocarburos componentes del petróleo de manera cuantitativa y cualitativa, mediante el uso de la bioestimulación con nitrógeno, fósforo y potasio y la bioaumentación. Se compararon 5 terrarios conformados de la siguiente manera : el primero por bacterias bioaumentadas reintroducidas con fertilizantes inorgánicos (B+F), el segundo por bacterias bioaumentadas reintroducidas sin fertilizante (B-F), el tercero por bacterias nativas con fertilizantes inorgánicos (N+F), el cuarto por bacterias nativas sin fertilizantes inorgánicos (N-F) y el quinto el control abiótico (CA).

Para el proceso de biodegradación bacteriana, se seleccionaron consorcios bacterianos de acuerdo a su capacidad degradativa y emulsificante (***Pseudomonas aeruginosa* TX-5**, ***Acinetobacter calcoaceticus* T2X-1**, ***Bacillus sp.* TX-4**) y por otro lado, para el proceso de bioestimulación se seleccionó una mezcla de componentes inorgánicos y se formuló la concentración de estos fertilizantes inorgánicos, de la siguiente manera (C/N : 100:1 y NPK: 20:20:1).

Los resultados en los terrarios de experimentación, determinaron que el terrario B+F, tuvo mayor porcentaje de biodegradación (71,4%), seguido del terrario N+F (66,7%), el terrario B-F (61,9%), N-F (52,3%) y CA (28%). Los componentes del petróleo que sufrieron mayor degradación fueron: n-pentano, n-hexano y n-decano. La población bacteriana tanto heterótrofa como oleofilica llegó a su mayor cantidad a los 30 días del experimento. La reintroducción de microorganismos nativos, tiene mayor efectividad en la biodegradación de crudo de petróleo, cuando el microorganismo dispone de fertilizantes inorgánicos.

ABSTRACT

The environmental contamination problem with oil spills mainly crude is important for the bad effects in earth and water ecosystems.

In the present study the capacity of bacterial for the hydrocarbons degradation quantitative and qualitatively with use of inorganic fertilizers with nitrogen, phosphorus and potassium (biostimulation) and the enhanced of bacterial cultures (bioaugmentation). We compared 5 containers: the first with enhanced bacterial culture and the inorganic fertilizers (B+F), the second with a enhanced bacterial cultures without inorganic fertilizers (B-F), the third with bacterial cultures isolated of Cañete soil with inorganic fertilizers (N+F), the fourth with bacterial cultures isolated of Cañete soil without inorganic fertilizers (N-F) and the fifth, abiotic control (CA).

For the bacterial biodegradation process were selected bacterial groups with biodegradation and bioemulsification capacity (***Pseudomonas aeruginosa* TX-5, Acinetobacter calcoaceticus T2X-1, Bacillus sp. TX-4**), in the other hand for the biostimulation process were selected inorganic fertilizers (C/N : 100:1 y NPK: 20:20:1).

The results in experimentation containers were that the container B+F obtained the higher average of biodegradation

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, propuestas para resolver la contaminación ambiental son de gran importancia y han despertado mucho interés, debido a las graves consecuencias que éste origina, permitiendo mejorar el ecosistema y por ende el bienestar de toda la humanidad.

La contaminación de los ecosistemas (terrestres y acuáticos) con petróleo, afecta no solo a la microbiota del suelo sino a la macrocomunidad residente. Así, los efectos perjudiciales del petróleo son vistos mejor sobre la flora dominante de ambientes terrestres, aunque paralelamente, es menos notorio el efecto ejercido sobre la comunidad animal (La Grega, 1996).

Los microorganismos que habitan en diferentes ambientes acuáticos y terrestres, según el clima y región geográfica son muy diversos y capaces de utilizar cualquier sustrato orgánico que se encuentre en su medio. Por consiguiente estos microorganismos tienen la capacidad de usar hidrocarburos, como única fuente de carbono y energía (Madigan, 1998).

El petróleo crudo, contiene varias clases de componentes hidrocarbonados que pueden ser clasificados en 4 grupos : saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (Apezteguía, 1999). Los componentes del petróleo que tienen efectos más nocivos, son los hidrocarburos aromáticos, puesto que algunos actúan como tóxicos agudos y otros, como el benzopireno, tienen actividad carcinogénica (Cisneros, 1996).

La biodegradación de hidrocarburos en suelos, es una alternativa que puede emplearse tanto para el tratamiento, como para la disposición final de los residuos producidos por las refinerías del petróleo (Morry, 1998). Las bacterias requieren de una amplia área de contacto entre ellas y el petróleo, para llevar a cabo, la emulsificación del petróleo en el medio acuoso circundante (Morris, 1997).

La capacidad de autodepuración de los suelos es restringida ya que las actividades de su población microbiana, verdadero motor de la biodegradación de residuos, se reprime con la incorporación masiva e irracional de residuos, ya sea por las altas concentraciones que retrasan su degradación o por su condición de residuos peligrosos (Pozzo, 1996).

Las tecnologías conocidas como “Landfarming” (biolabranza), “Land Treatment” (biotratamiento de suelos) o “Land Application” (biorremediación de suelos), son métodos de remediación de hidrocarburos del petróleo a través de la biodegradación (Belloso, 1998).

La biorremediación, es la adición de microorganismos y fertilizantes a ambientes contaminados, para acelerar el proceso natural de biodegradación. En el caso de los derrames de petróleo, se trata empleando varias técnicas, incluyendo la adición de fertilizantes para facilitar la descomposición del crudo por las bacterias. Sin embargo, existen diferentes factores que limitan la biodegradación de los hidrocarburos, como son la disponibilidad de nutrientes como el nitrógeno, fósforo y potasio, disponibilidad del sustrato, temperatura, pH, oxígeno, humedad, porosidad del suelo, textura, permeabilidad, población microbiana y otros. Por eso es de suma importancia controlar estos parámetros a fin de mejorar los procesos de biorremediación, disminuyendo principalmente tiempo y costo en su aplicación (Ortiz, 1999). La reintroducción de microorganismos nativos aislados de un medio contaminado con petróleo, parece ser el método de biorremediación más efectivo, especialmente cuando el crecimiento del microorganismo está suplementado por oxígeno y fertilizantes (Korda, 1997).

Se han reportado numerosos trabajos de investigación sobre biodegradación de hidrocarburos por microorganismos, los cuales, están enfocados como una alternativa para solucionar problemas de contaminación ambiental por petróleo.

En el presente estudio, se ha evaluado de manera cuantitativa y cualitativa, la capacidad degradadora de bacterias en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo crudo con la fertilización que es un método de biorremediación con nutrientes inorgánicos como nitrógeno, fósforo y potasio, para estimular el crecimiento de microorganismos nativos y cultivados y la técnica de la inoculación, que se refiere a la adición de microorganismos a un sitio contaminado, los cuales pueden agregarse junto con nutrientes. La comprensión del proceso, permitirá diseñar estrategias para aprovechar las propiedades degradativas de los microorganismos. Por ello el interés en el presente estudio, como un aporte para un mejor conocimiento de microorganismos degradadores de petróleo, para que este proceso se constituya en un mecanismo potencial de biorremediación, que contribuya a la conservación de nuestro medio ambiente.

HIPÓTESIS

La bioestimulación de microorganismos hidrocarbonoclasticos (degradadores de petróleo) mediante la adición de nitrógeno, fósforo y potasio, constituye un factor importante para lograr una biodegradación eficiente en suelos contaminados con crudo de petróleo.

OBJETIVOS:

Objetivo general

- Evaluar la capacidad biodegradativa de un consorcio bacteriano, mediante la aplicación de fertilizantes inorgánicos como el nitrógeno, fósforo y potasio (bioestimulación) en suelos contaminados con petróleo crudo.

Objetivos específicos

1. Aislar cepas nativas degradadoras de hidrocarburo, procedentes del suelo.
2. Seleccionar consorcios bacterianos nativos y reintroducirlos.
3. Evaluar el efecto de la concentración de nitrógeno, potasio y fósforo (bioestimulación) sobre la actividad degradativa de la biorremediación.
4. Evaluar el efecto de la bioaumentación bacteriana, (inoculación) en suelos contaminados con petróleo crudo.

2. ANTECEDENTES

- Lopólito M. y col. 2005. Llevaron a cabo experimentos de biodegradación de hidrocarburos utilizando diferentes sustratos como el petróleo, kerosene, aceite lubricante y benceno, y como nutriente un medio mínimo y fertilizante foliar comercial, concluyendo que la inoculación previa acelera el proceso de degradación.
- Morgan M. y col. 2005. Aplicaron biorremediación en 20 m² de suelo contaminado con petróleo, durante 369 días, en este suelo se adicionaron nutrientes inorgánicos, aireación y humedad, obteniéndose valores < a 1% de concentración de hidrocarburos recomendada por normas internacionales.
- Abalos A. y col. 2004. Estudiaron los ramnolípidos de ***Pseudomonas aeruginosa*** AT10, determinando que la adición de los mismos, acelera la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en un 61% en 10 días de incubación.
- Bracho M. y col. 2004. Llevaron a cabo un estudio respecto a la degradación bacteriana sobre naftaleno, antraceno, fenantreno y dibenzotiofeno. Las bacterias degradadoras aisladas a partir del suelo estudiado fueron: ***Pseudomonas*** (54.05%), ***Bacillus*** (24.30%), ***Staphylococcus*** (16.20 %) y ***Micrococcus*** (5.4 %); además determinaron que el 100% de cepas, degradaron el naftaleno y antraceno, el 78.5% fenantreno, el 71.42% dibenzotiofeno y 50% los cuatro hidrocarburos.
- Pardo J. y col. 2004. Midieron la efectividad de la biolabranza (landfarming), durante 4 meses, adicionando fertilizantes inorgánicos, obteniendo al finalizar el experimento, un porcentaje de remoción de hidrocarburos del 91%.
- Volke T. y col. 2003. Realizaron un trabajo en biodegradación de hidrocarburos de petróleo y determinaron que los pre-tratamientos electroquímico y mediante adición de surfactantes, adicionales al composteo, produjeron una degradación del 48% y 46% respectivamente.
- Zucchi M. y col. 2003. Evaluaron la respuesta de una comunidad bacteriana durante la biorremediación en un lapso de 72 días con bioestimulación y aireación adecuada, adición de nutrientes y surfactantes obteniendo una reducción final de hidrocarburos del 39.5%.

- Escalante R. 2002. Desarrolló un estudio sobre la biodegradación del crudo de petróleo en 3 terrarios durante 90 días, se aislaron 129 cepas bacterianas de las que presentaron una mejor actividad biodegradativa las especies: ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Bacillus sp.*** y ***Serratia rubidae***, las mismas que conformaron el consorcio utilizado en ese experimento. En el primer terrario, donde se inoculó el consorcio exógeno sin fertilizantes, se logró una biodegradación del 92.5% , en el segundo terrario, que estuvo conformado por bacterias nativas, el porcentaje de biodegradación logrado fue del 60% y finalmente, en el tercer terrario que correspondía al control abiótico, la biodegradación fue del 55%.
- Margesin R. , Schinner F. 2001. Investigaron la factibilidad de la biorremediación, como tratamiento opcional de suelos contaminados con hidrocarburos. Para examinar la eficiencia de la atenuación natural y bioestimulación, utilizaron un mesocosmos tanto con suelos fertilizados y no fertilizados con NPK. El nivel inicial de contaminación fue reducido aproximadamente en un 50% y 70% en suelo no fertilizado y fertilizado respectivamente.
- Mishra S. y col. 2001. Analizaron el potencial de la biorremediación de un consorcio bacteriano en suelos pertenecientes a una refinería, dividieron el terreno de estudio en 4 bloques A, B, C y D de los que A, B y C fueron tratados con consorcio y D fue control no tratado. En los bloques donde se aplicó el consorcio bacteriano y nutrientes se observó un porcentaje de biodegradación de 90.2%, mientras que en el bloque D , un 16.8%, el experimento se desarrolló durante un período de 120 días.
- Nwachukwu S. 2001. Inoculó ***Pseudomonas putida*** en suelos contaminados con petróleo, adicionando nutrientes inorgánicos en algunos. La mayor efectividad de degradación se obtuvo a las 9 semanas, esto se corroboró por el crecimiento de ***Lepidium sp.*** , usado como evidencia de biorrecuperación; el porcentaje de germinación de éste, fue de 27,5% en suelos no fertilizados y de 98,8% en suelos fertilizados.
- Parales R. el año 2000. Evaluó la capacidad degradativa y reacción quimiotáctica de cinco cepas, determinando que ***Pseudomonas putida***, degrada de manera eficaz los hidrocarburos.
- Belloso C. 1999. Evalúa el porcentaje de biodegradación durante el proceso “landfarming” (biolabranza), usando microorganismos exógenos y microorganismos nativos sin aplicación de fertilizantes, el estudio tuvo una duración de 3 meses. La

eficiencia de la degradación fue del 84% (en el terrario N° 1, con microorganismos exógenos) y del 49% (en el terrario N° 2, con microorganismos nativos).

- Deyta A. y Saval S. 1999. Analizan la degradación de benceno, tolueno y xileno (BTX) en suelos de dos sitios contaminados con gasolina y concluyeron que las diferencias de velocidades y porcentaje de degradación de un sitio a otro se debían a la combinación de factores como la humedad, adición de nutrientes y bacterias aclimatadas; asimismo la eficiencia dependió del tipo de suelo.
- Machin J. y col. 1999. Observaron el efecto de la bioestimulación en la biodegradación de hidrocarburos de suelo contaminado, en reactores de fase semisólida, encontrando que mediante la adición de un fertilizante, se obtenía un elevado porcentaje de degradación. El suelo tratado presentaba altos niveles de contaminación por hidrocarburos; de esta manera la bioestimulación en fase sólida puede considerarse como alternativa para la biorremediación del suelo.
- Morales D. y col. 1999. Aislaron y seleccionaron consorcios microbianos con capacidad para degradar hidrocarburos de dos fuentes: una contaminada con hidrocarburos (IMP) y otra no contaminada (composta residual). La degradación de hidrocarburos fue de 25,48% para el consorcio IMP y de 22,37%, para el consorcio de la composta.
- Ortiz A. y col. 1999. Seleccionaron un material texturizante orgánico (bagazo de caña y composta) el mismo que presentaba las mejores características como soporte en los biorreactores tipo columna por incremento de porosidad, resistencia de agua, resistencia del diclorometano y alta recuperación de hidrocarburos; asimismo determinan un porcentaje de biodegradación de 9.35 % para el consorcio IMP , 14,77 % para el consorcio IMP+ composta y un 25% para IMP+ bagazo de caña.
- Aislabie J. y col. 1998. Estudiaron el potencial de la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo en suelos de la Antártida, demostrando que el nitrógeno incrementa significativamente la mineralización de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo crudo.
- Belloso C. y Carrario J. 1998. Compararon la actividad hidrocarburoolítica de diferentes cepas bacterianas en suelos "landfarming" contenidos en terrarios, con aplicación de 2 concentraciones de fertilizantes NPK en las proporciones de C/N: 20:1, y NPK: 20:2:1 en el primer caso (Z1) y proporciones de C/N:

100:1, y NPK: 20:20:1 en el segundo caso (Z2), observándose el porcentaje más alto de reducción de hidrocarburos (45%) en los primeros 30 días en el terrario con el fertilizante Z2. La cepa W2 resultó ser la de mayor capacidad hidrocarburoolítica.

- Merino F. 1998. Llevó a cabo un estudio de microorganismos nativos productores de emulsificantes de petróleo, indicando que los microorganismos con mayor capacidad emulsificante y degradativa, fueron las cepas : ***Pseudomonas aeruginosa* KT1-1** y ***Serratia rubidae* BT5-4**.
- Rentería A. y Miranda H. 1998. Evaluaron el crecimiento sobre el petróleo de noventa cepas bacterianas, correspondientes a diversos géneros, provenientes de muestras de agua y suelos contaminados con petróleo crudo; los géneros que mostraron mayor actividad degradativa fueron: ***Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium***, los mismos que se evaluaron a través de parámetros cinéticos, velocidad específica de crecimiento y tiempo generacional.
- Dagher F. y col. 1997. Realizaron un estudio comparativo de 5 cepas del suelo degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos ; ***Sphingomonas sp.*** Cepa 107, fue la cepa con mayor capacidad degradadora, seguida de ***Pseudomonas aeruginosa*** cepas 57 y PL1. Los biosurfactantes fueron producidos por ***Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*** y el bioemulsificante por ***Sphingomonas sp.***
- Delille D. y col. 1997. Analizaron la efectividad de la biorremediación en aguas, mediante la adición del fertilizante INIPOL EAP22 (NPK), dicho fertilizante indujo al aumento de microflora saprofítica y degradadora de hidrocarburos, incrementando la efectividad de la biodegradación de hidrocarburos del petróleo.
- Hanson K. y col. 1997. En su estudio con la bacteria ***Acinetobacter sp.*** cepa A3 demuestran que esta cepa , en un tiempo de 120 horas bajo condiciones de agitación constante, en un suelo contaminado con petróleo (5%) es capaz de degradar los hidrocarburos del petróleo crudo, logrando un porcentaje de eficiencia del 70%.
- Korda A. y col. 1997. Indicaron que los métodos analíticos para medir la biodegradación de hidrocarburos de petróleo varían en efectividad; la biodegradación in vitro varía cuando se expone al microorganismo frente a un amplio rango de contaminantes, resultando limitada; llegaron a concluir que la reintroducción de

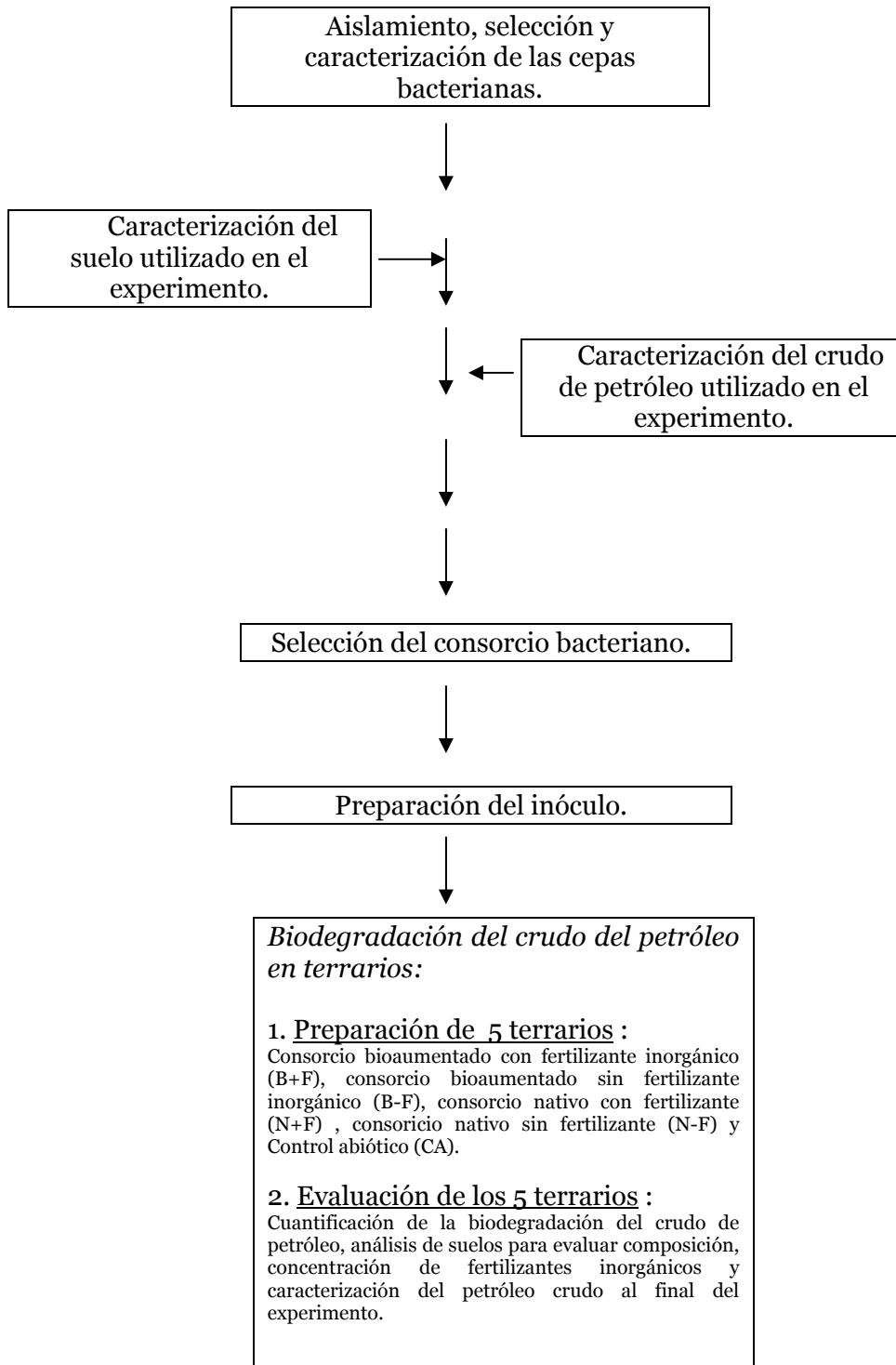
microorganismos nativos, parece ser el método de biorremediación más efectivo.

- Margesin R. y Schinner F. 1997. Evaluaron la eficiencia de la biodegradación con microorganismos nativos del suelo , un inóculo psicrotrófico degradador de diesel y el efecto de la bioestimulación por medio de la fertilización inorgánica. Determinaron que la bioestimulación por fertilización, incrementa la biodegradación del diesel por bacterias nativas. Un 16% al 23% de la contaminación se perdió por procesos abióticos, mientras que el total de decontaminación sin y con fertilizante, estuvo en un rango de 16% al 31% y 27% a 53%, respectivamente.
- Zhonggi H. 1997. Estudió la manera cómo ***Pseudomonas pseudoalcaligenes JS45*** utiliza nitrobenceno como única fuente de carbono, nitrógeno y energía; mediante la investigación logró determinar que la cepa en estudio, degrada nitrobenceno mediante una serie de complejas y numerosas reacciones enzimáticas.
- Mac Gillvray A. y Shiaris M. 1994, estudiaron el rol de los microorganismos eucarióticos (levaduras) y procarióticos (bacterias) de un sedimento costero relativo a la biotransformación del hidrocarburo fenantreno por dos métodos diferentes: detección de metabolitos marcados y uso de inhibidores selectivos (estreptomina y colchicina). Mencionan que tanto levaduras como bacterias pueden transformar el fenantreno, pero la contribución de los microorganismos eucarióticos fue solo del 3%, concluyendo que los degradadores de fenantreno predominantes en dicho sedimento son bacterias y no levaduras.
- Radwans y col. 1995. Desarrollaron un estudio sobre el manejo de suelos procedentes de Kuwait para mejorar la biodegradación en suelos, aplicando fertilización repetida, el componente más efectivo fue el KNO_3 al 3% agregado en solución; las muestras contenían predominantemente los géneros bacterianos: ***Pseudomonas, Bacillus, Rhodococcus y Streptomyces.***
- Haigler B. 1993. Aisló la cepa ***Pseudomonas sp.*** 4 NT de un suelo contaminado con 4-nitro benceno y comprobó que esta cepa bacteriana tiene también una buena capacidad degradativa frente al nitrotolueno. Los extractos celulares convirtieron el 4-nitrobenzoato a protocatecuato; la degradación se llevó a cabo bajo condiciones anaeróbicas.

- Buckley y col. 1976. Aislaron bacterias y hongos de un ecosistema estuarino no poluido por petróleo o sus derivados, las especies bacterianas que mostraron capacidad de utilizar hidrocarburos de kerosene como única fuente de carbono fueron caracterizadas en los géneros ***Pseudomonas***, ***Corynebacterium***, ***Aeromonas***, ***Micrococcus*** y ***Arthrobacter***.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

FLUJOGRAMA DEL TRABAJO EXPERIMENTAL



3.1 MATERIALES

- Materiales de vidrio (Anexo 8.1).
- Medios de cultivo (Anexo 8.2).
- Equipos y Aparatos (Anexo 8.3)
- Suelo de cultivo procedente de Cañete.
- Petróleo crudo procedente de la refinería “La Pampilla”.

3.2 MÉTODOS

3.2.1. MUESTREO

3.2.1.1. DE SUELOS PARA EL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS

Se obtuvieron 5 muestras de aproximadamente 1 kg de suelo de cultivo procedente de Cañete, las mismas que fueron transportadas al laboratorio de Microbiología y Biotecnología microbiana de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en bolsas de polietileno de primer uso debidamente etiquetadas en el menor tiempo posible para su procesamiento inmediato.

3.2.1.2. DE SUELOS DE TERRARIOS PARA EVALUAR LA BIODEGRADACIÓN DE CRUDO EN TERRARIOS

Se obtuvieron un total de 20 muestras de 1 kg de suelo cada una, a partir de terrarios que contenían 30 kg de suelo cada uno, procedente de Cañete y contaminado con petróleo según diseño del experimento.

A partir de estas muestras, se evaluó:

- Microorganismos aerobios mesófilos
- Microorganismos oleofílicos
- Hidrocarburos totales
- Análisis físico-químico de cada uno de los suelos (ver cuadros de resultados)

Las muestras de la 1 a la 5, correspondieron a la fase inicial del experimento (día 0) , a partir de las que se obtuvieron los valores iniciales.

Las muestras de la 6 a la 10, correspondieron a la segunda fase de experimentación (30 días).

Las muestras de la 11 a la 15, correspondieron a la tercera fase del experimento (60 días).

Las muestras de la 16 a la 20, correspondieron a la cuarta fase y fase final del experimento (90 días).

Se procesaron las muestras correspondientes, cada una con dos repeticiones.

3.2.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

3.2.2.1. Método de aislamiento y purificación de bacterias degradadoras del petróleo (Merino y col. 1991)

- Se suspendió, 5 g de tierra en agua destilada estéril (0,85%).
- Se Sembró en medios de preenriquecimiento : Caldo Palleroni (25 ml) y Caldo Acetato Mineral (25 ml).
- Se incubó las muestras a 30°C en agitación constante (150 r.p.m), durante 72 horas.
- Transcurrido el tiempo para el aislamiento de bacterias se procedió a sembrar por estrías en placas que contenían Agar King B a partir de Caldo Palleroni y en Agar Cerebro Corazón (BHI) a partir del Caldo Acetato Mineral y de la suspensión de suelo en solución salina.
- Se incubó las placas a 30°C por 48 horas.
- Se aisló colonias de las diferentes placas, según su morfología de crecimiento y procedencia de la muestra. Luego se resembró las colonias seleccionadas para su purificación en tubos que contengan 2 ml de Caldo nutricio e incubarlas a 30°C por 48 horas.
- Transcurridas las 48 horas, se procedió a sembrar las cepas en Agar nutricio para verificar su pureza e incubarlas nuevamente a 30°C por 48 horas. Se seleccionó las colonias aisladas y se sembró por estrías en viales con Agar nutricio y se incubó a 30°C por 48 horas.
- Se observó el crecimiento de la cepa pura , se taponó los viales con tapones de jebe estériles y se sellaron con parafina. Se mantuvo el cepario en refrigeración a 4°C.

3.2.2.2. Método para determinar actividad bacteriana emulsificante (Goldman y col. 1982) - (Anexos-Esquema N° 3)

- Se reactivaron las cepas en 2 ml de Caldo nutricio y se incubaron a 37°C por 24 horas.
- Se preparó el medio Mínimo de Goldman, con extracto de levadura al 3% esterilizándolo, excepto el etanol para agregarlo posteriormente en condiciones de esterilidad.
- Se repartió en matraces 18 ml de Medio Mínimo de Goldman . Se adicionó después los 2 ml de cultivo. Se incubó, a 30°C durante 72 horas en agitación constante (150 r.p.m).
- Transcurrido el tiempo, se centrifugó el cultivo a 5000 r.p.m. por 30 minutos.
- Se colectó 10 ml del sobrenadante en tubos de prueba 16 x 150 mm, previa decantación, luego se agregó a cada tubo con sobrenadante 0,2 ml de petróleo crudo y se agitó manualmente durante 5 minutos (para facilitar la emulsión).
- Se trasvasó 5ml de la preparación anterior a tubos de Spectronic 13 X 100 mm para la lectura de absorbancia a 540 nm El blanco correspondió al medio de cultivo sin inoculación.
- Se convirtió la lectura de absorbancia en unidades de actividad emulsificante por ml (UAE/ml), siendo 0,816 de absorbancia equivalente a una unidad de actividad emulsificante/ml .

3.2.2.3. Método para determinar capacidad biodegradativa de cepas bacterianas (Mills y col. 1978) - (Anexos-Esquema N° 4)

- Se reactivaron las cepas en Caldo Nutricio y se incubó a 30°C por 12 horas.
- Se preparó el Medio Mineral , al cual se le adicionó petróleo crudo como única fuente de carbono.
- Se repartió 9 ml del medio en tubos de 16 X 150 mm, se añadió 1 ml del cultivo, y se incubó a temperatura ambiente por 30 días.
- Transcurrido el tiempo, se midió el crecimiento cualitativamente por la turbidez visible del medio de cultivo. Se consideró como blanco negativo, un tubo conteniendo los componentes del medio sin inoculación.
- Se realizaron las lecturas tomando en cuenta que una turbidez de 2 (++) , equivalente a una población superior a 6×10^8 microorganismos/ml, en la escala turbidimétrica de Mc. Farland; 3 (+++) con una población superior a 9×10^8

microorganismos/ml, equivalió a un crecimiento bueno y una turbidez de 5 (+++++) con una población superior a 15×10^8 microorganismos/ml, y correspondió a un crecimiento muy bueno, el mismo que significó la emulsión total del petróleo en agua.

3.2.2.4. Identificación Taxonómica

Para la identificación taxonómica se procedió inicialmente a efectuar la coloración Gram, de acuerdo a los resultados obtenidos las cepas bacterianas fueron agrupadas según su morfología en cocos, cocobacilos, bacilos, y según sus características tintoriales, en bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Para diferenciar entre bastones Gram positivos y cocos Gram positivos, se realizó la prueba de la catalasa, mientras que la prueba de la oxidasa fue aplicada a todas las cepas bacterianas Gram negativas. Según el Manual de Bacteriología determinativa de Bergey's (1997). Los bastones y cocobacilos Gram negativos oxidasa negativos, fueron identificados mediante pruebas bioquímicas según Bergey's y para la identificación de los bacilos y cocobacilos gram negativos, positivos a la prueba de la oxidasa, se utilizó el sistema API 20NE.

3.2.2.5. Selección del consorcio bacteriano

El consorcio bacteriano elegido correspondió a 3 especies de bacterias, las mismas que fueron seleccionadas según su mayor capacidad degradativa y emulsificante.

3.2.2.6 Preparación del inóculo (Bioaumentación)

Las cepas integrantes del consorcio bacteriano fueron reactivadas a las 24 horas (bioaumentación), fueron inoculadas cada una por separado en 3,5 ml de caldo nutritivo, al cabo de 24 horas, nuevamente fueron inoculadas en 35 ml de Medio Mineral, el mismo que contenía petróleo como única fuente de carbono al 5%. Finalmente se procedió a inocular en 350 ml de Medio mineral+petróleo.

Este procedimiento se realizó por triplicado para cada cepa, hasta alcanzar un volumen aproximado de 3 litros (10% del volumen del terrario).

El recuento de la población bacteriana de cada cepa se realizó por método de Recuento en Placa (Plate count Agar).

3.2.2.7. Método para el recuento de bacterias aerobias mesófilas (Merino y col. 1991) – (Anexos-Esquema N°1)

- Se pesaron 10 g de la muestra de suelo y se agregó a 90 ml de solución salina al 0,85% (dilución 10^{-1}), luego se pipeteó 1ml de la dilución 10^{-1} y se pasó a un tubo que contiene 9 ml de solución salina en el mismo porcentaje que la anterior (10^{-2}) y se continuó con el procedimiento en las mismas condiciones pasando 1 ml de tubo a tubo, hasta lograr una dilución de 10^{-6} .
- A partir de cada dilución y empezando de 10^{-6} se colocó con ayuda de la pipeta 0,1 ml de cada dilución en 6 placas (cada una correspondiente a una dilución) que contenían Plate Count Agar, para recuento de bacterias aerobias mesófilas. Se realizó el mismo procedimiento para cada dilución y se colocó 0,1 ml a cada placa con Agar Cetrimide, para recuento de bacterias oleofílicas. Con ayuda de una espátula de Drigalski se esparció en las placas homogéneamente la muestra.
- Se incubó las placas a 30°C por 24 a 48 horas y realizó el recuento correspondiente.

3.2.2.8. Método para el recuento de bacterias Oleofílicas (Merino y col. 1991) – (Anexos-Esquema N°2)

- Se pesó 10 gr de la muestra de suelo y se agregó a 90 ml de solución salina al 0,85% (dilución 10^{-1}), luego se pipeteó 1ml de la dilución 10^{-1} y se pasó a un tubo que contenía 9 ml de solución salina, en el mismo porcentaje que la anterior (10^{-2}) y se continuó con el procedimiento en igualdad de condiciones pasando 1 ml de tubo a tubo, hasta lograr una dilución de 10^{-6} .
- A partir de cada dilución y empezando de 10^{-6} , se colocó con ayuda de la pipeta 0,1 ml de cada dilución a 3 tubos con 9 ml de Medio Mineral.
- Se incubó los tubos a 30°C por 15 días y se realizó el recuento correspondiente, se hicieron las lecturas correspondiente y se determinó resultados por medio del Método del Número más probable para recuento bacteriano.

3.2.2.9. Preparación de los terrarios de experimentación.

Se trabajó con 5 terrarios; los mismos que fueron preparados, incluyendo en ellos:

Terrarios N° 1: (B+F: bioaumentado con fertilizante inorgánico).

- 30 kg de suelo procedente de Cañete.
- 3 litros de cepas bioaumentadas (TX4, TX5, T2X-1).
- 2 litros de agua destilada.
- Fertilizantes inorgánicos (NPK: 20:20:1), correspondiendo por cada kilogramo de tierra: 1,62 g de NO_3NH_4 , 0,067 g de $(NH_4)_2HPO_4$ y 0,087 g de K_2HPO_4 .
- 1,5 litros de crudo de petróleo.

Terrarios N° 2: (B-F: bioaumentado sin fertilizante inorgánico).

- 30 kg de suelo procedente de Cañete.
- 3 litros de cepas bioaumentadas (TX4, TX5, T2X-1).
- 2 litros de agua destilada.
- 1,5 litros de crudo de petróleo.

Terrarios N° 3: (N+F: nativo con fertilizante inorgánico)

- 30 kg de suelo procedente de Cañete.
- 5 litros de agua destilada.
- Fertilizantes inorgánicos (NPK: 20:20:1), correspondiendo por cada kilogramo de tierra: 1,62 g de NO_3NH_4 , 0,067 g de $(NH_4)_2HPO_4$ y 0,087 g de K_2HPO_4 .
- 1,5 litros de crudo de petróleo.

Terrarios N° 4: (N-F: Nativo sin fertilizante inorgánico)

- 30 kg de suelo procedente de Cañete.
- 5 litros de agua destilada.
- 1,5 litros de crudo de petróleo.

Terrarios N° 5: (CA: Control abiótico)

- 30 kg de suelo procedente de Cañete.
- 5 litros de agua destilada.
- 450 g de Biclورو de Mercurio.
- 1,5 litros de crudo de petróleo.

3.2.2.10. Caracterización del suelo de Cultivo (Cuadro N°1)

Se procedió a determinar las características de importancia para el estudio. Así tenemos:

- Textura
- Salinidad
- Materia orgánica
- Carbono
- Nitrógeno
- Fósforo
- Potasio
- pH

Todos estos análisis fueron desarrollados, según métodos estandarizados, en el Laboratorio Especializado de Suelos de la Facultad de Ingeniería Agrícola de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), según metodología estandarizada en cada caso.

CUADRO N° 1. Caracterización del suelo procedente de Cañete utilizado en el estudio

| PARÁMETRO | VALOR |
|-----------------------|--------------|
| pH | 7,7 |
| C.E. (dS/m) | 3,10 |
| M.O. (%) | 1,81 |
| CaCO ₃ (%) | 3,33 |
| N Total (%) | 0,13 |
| P (ppm) | 93 |
| K (ppm) | 544 |
| Arena (%) | 22 |
| Limo (%) | 52 |
| Arcilla (%) | 26 |

Clase textural: Franco limoso

3.2.2.11. Medición de la temperatura del suelo (Cuadro N° 11)

Se procedió a medir la temperatura en cada terrario, haciendo uso de un termómetro especial para suelos. Las mediciones se realizaron cada quince días a horas determinadas (6 horas, 12 horas y 20 horas), de las cuales se obtuvo un promedio que se reportó en el cuadro correspondiente.

3.2.2.12. Biodegradación del crudo de petróleo en terrarios

Para poder analizar la biodegradación en los terrarios se procedió a realizar:

- Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales (Anexos-Esquema N° 1).
- Microorganismos oleofílicos totales (Anexos-Esquema N° 2).
- Hidrocarburos totales (Anexos-Flujograma N° 2).
- Medición de la temperatura en los terrarios (Cuadro N° 11).
- Análisis físico-químico de cada uno de los suelos (Cuadros N° 8, 9 y 10).
- Análisis cromatográfico del crudo de petróleo al inicio y al final del experimento (Cuadro N°2 , Cuadro N° 12)

3.2.2.13. Caracterización del Crudo de Petróleo

Se determinó la composición química porcentual del destilado de crudo de petróleo, proveniente de la Refinería “La Pampilla”, al inicio y al final del experimento, mediante la técnica de Cromatografía de Gases.

Los análisis fueron desarrollados en la Unidad de Servicios de análisis Químicos (USAQ) de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

CUADRO N° 2. Características del destilado del crudo de petróleo al inicio del experimento.

| N° | COMPONENTES | PM | FÓRMULA | % |
|----|--------------------|-----|---------------------------------|-------|
| 1 | n-pentano | 76 | C ₅ H ₁₂ | 0.49 |
| 2 | n-hexano | 86 | C ₆ H ₁₄ | 0.77 |
| 3 | n-heptano | 100 | C ₇ H ₁₆ | 0.57 |
| 4 | 2 metil pentano | 72 | C ₆ H ₁₄ | 0.64 |
| 5 | 3 metil hexano | 100 | C ₇ H ₁₄ | 1.82 |
| 6 | 1,1,2 trimetil | 126 | C ₉ H ₂₈ | 2.18 |
| 7 | ciclohexano | 84 | C ₆ H ₁₂ | 2.14 |
| 8 | 1-hexeno | 86 | C ₇ H ₁₆ | 2.05 |
| 9 | 2 metil hexano | 114 | C ₈ H ₁₈ | 7.58 |
| 10 | 2 etil hexano | 114 | C ₁₁ H ₂₄ | 9.52 |
| 11 | 2 metil decano | 156 | C ₁₂ H ₂₆ | 0.38 |
| 12 | 4 metil decano | 128 | C ₉ H ₂₀ | 13.17 |
| 13 | n-nonano | 170 | C ₁₂ H ₂₆ | 5.95 |
| 14 | 2 metil undecano | 142 | C ₁₀ H ₂₂ | 9.39 |
| 15 | 3,5 dimetil octano | 170 | C ₁₂ H ₂₆ | 2.55 |
| 16 | 2 metil undecano | 170 | C ₁₂ H ₂₆ | 8.56 |
| 17 | dodecano | 184 | C ₁₃ H ₂₈ | 7.86 |
| 18 | n-tridecano | 198 | C ₁₄ H ₃₀ | 5.09 |

| | | | | |
|----|-------------------|-----|---------------------------------|------|
| 19 | n-tetradecano | 198 | C ₁₄ H ₃₀ | 3.48 |
| 20 | tetradecano | 198 | C ₁₄ H ₃₀ | 3.90 |
| 21 | 2 metil tridecano | 212 | C ₁₅ H ₃₂ | 3.93 |
| 22 | n-pentadecano | 212 | C ₁₅ H ₃₂ | 1.37 |
| 23 | pentadecano | 226 | C ₁₆ H ₃₄ | 1.22 |
| 24 | n-hexadecano | 240 | C ₁₇ H ₃₆ | 0.96 |
| 25 | n-heptadecano | 254 | C ₁₈ H ₃₈ | 0.85 |
| 26 | n-octadecano | 254 | C ₁₈ H ₃₈ | 0.77 |
| 27 | octadecano | 282 | C ₂₀ H ₄₂ | 0.71 |
| 28 | n-eicosano | 296 | C ₂₁ H ₄₄ | 0.55 |
| 29 | n-henicosano | 310 | C ₂₂ H ₄₆ | 0.43 |
| 30 | n-dodocosano | 352 | C ₂₅ H ₅₂ | 0.37 |
| 31 | n-pentacosano | 394 | C ₂₈ H ₅₈ | 0.20 |
| 32 | n-octacosano | 408 | C ₂₉ H ₆₀ | 0.20 |
| 33 | n-nonacosano | 422 | C ₃₀ H ₆₂ | 0.20 |
| 34 | n-triacontano | 450 | C ₃₂ H ₆₆ | 0.10 |

3.2.14. **Formulación de los fertilizantes inorgánicos (bioestimulantes)** – (Anexos- Flujoograma N° 2)

Se seleccionó la proporción mencionada por Claudio Beloso y otros autores, por ser ésta la más efectiva para el proceso de biodegradación, teniendo en cuenta lo siguiente:

C/N: 100:1

NPK: 20:20:1

Se utilizó:

NO_3NH_4 , como fuente de nitrógeno.

$(NH_4)_2HPO_4$, como fuente de fósforo.

K_2HPO_4 , como fuente de potasio.

3.2.2.15. **Método de cuantificación total de hidrocarburos (método 3540 EPA).**

El fin de este método, es extraer los hidrocarburos de cada muestra mediante Soxhlet, para esto se procedió de la siguiente manera:

- Se mezcló 25 g de muestra con 25 g de sulfato de sodio anhidro y se procedió a la extracción con Soxhlet utilizando como solvente éter dietílico a una temperatura constante de 60 °C durante 12 horas.

- Transcurrido el tiempo, se redujo el volumen del solvente en un rotavapor hasta obtener un volumen menor a 10 ml .
- Se secó el extracto adicionando 0,1 g de sulfato de sodio anhidro y se transfirió mediante enjuagues a un vial previamente pesado, después de la evaporación del solvente a 25°C, se cuantificó el hidrocarburo extractable.

3.2.2.16. Análisis estadístico

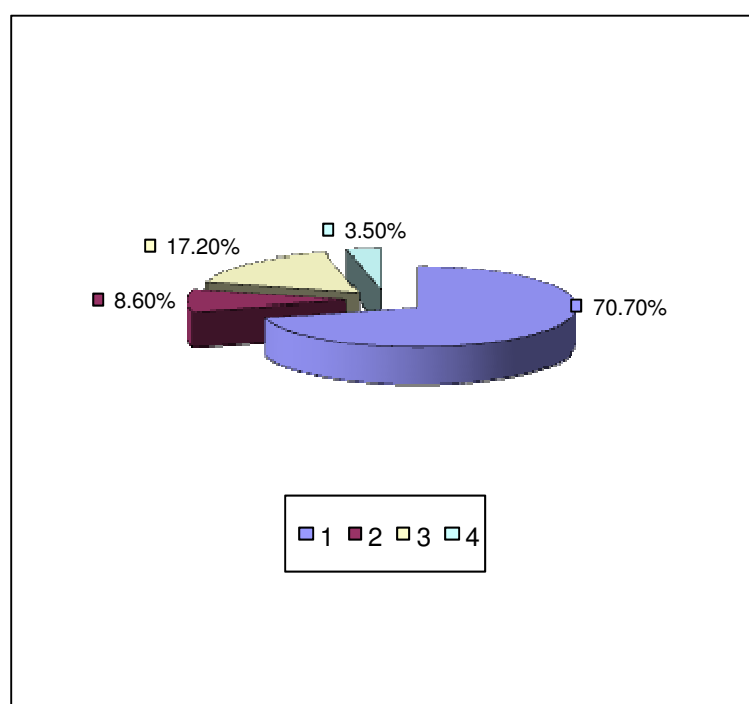
El análisis estadístico se realizó aplicando :

- Prueba de Wilks
- Prueba de Regresión
- Prueba de F
- Prueba de t-student

4. RESULTADOS

4.1. BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS

Se aisló un total de 58 cepas a partir de 10 muestras de suelos procedentes de tierras de cultivo de Cañete, Lima.

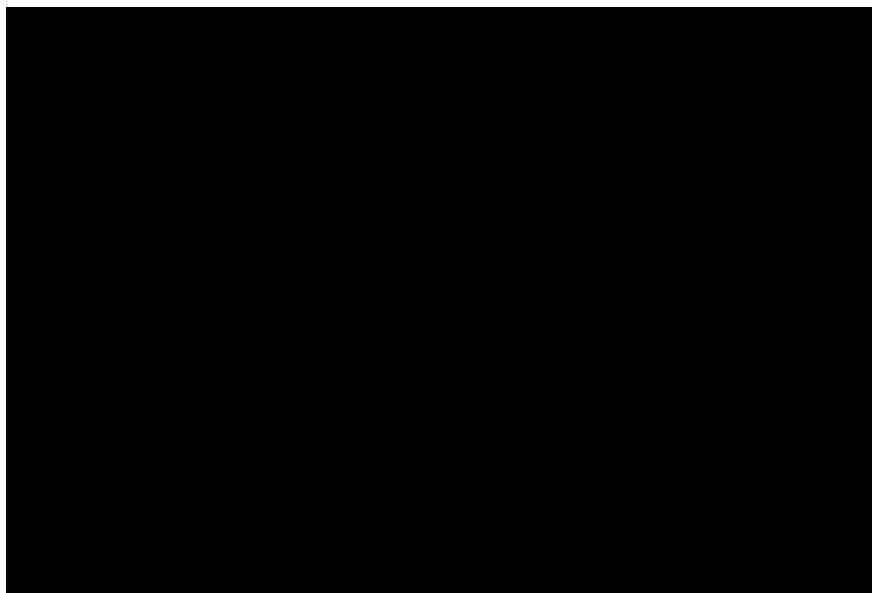


1. Bacilos Gram negativos (BG-), **2.** Cocobacilos Gram negativos (CBG-),
3. Bacilos Gram positivos (BG+), **4.** Cocos Gram positivos (CG+).

GRÁFICO N° 1. Porcentaje de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas según morfología y características tintoriales.

4.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

De cada una de las 58 cepas aisladas se realizó la identificación respectiva , resultando de la siguiente manera:



1. Pseudomonas, 2. Acinetobacter, 3. Bacillus, 4. Serratia, 5. Hafnia, 6. Staphylococcus, 7. Enterobacter, 8. Citrobacter, 9. Listonella, 10. Micrococcus

GRÁFICO N° 2. Géneros bacterianos en porcentajes aislados a partir de suelos procedentes de Cañete

4.3. ACTIVIDAD EMULSIFICANTE DE LAS BACTERIAS DEGRADADORAS DEL PETRÓLEO.

La actividad emulsificante se expresa en unidades de actividad emulsificante por ml (UAE/ml), siendo 0,816 de absorbancia equivalente a una unidad de actividad emulsificante/ml (Goldman y col. 1982).

CUADRO N° 3 . Actividad emulsificante de las cepas bacterianas aisladas.

| CEPAS | ESPECIE | ACTIVIDAD EMULSIFICANTE (UAE/ml) |
|-------|-------------------------------|----------------------------------|
| TX-1 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2.5 |
| TX-2 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2.0 |
| TX-3 | <i>Pseudomonas cepacia</i> | 1.3 |

| | | |
|--------|------------------------------------|-----|
| TX-4 | <i>Bacillus sp.</i> | 3.8 |
| TX-5 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4.9 |
| TX-6 | <i>Pseudomonas cepacia</i> | 2.4 |
| TX-7 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 0.5 |
| TX-8 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | 0.5 |
| TX-9 | <i>Pseudomona cepacia</i> | 2.6 |
| TX-10 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1.9 |
| TX-11 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1.4 |
| TX-12 | <i>Hafnia alvei</i> | 0.2 |
| TX-13 | <i>Bacillus sp.</i> | 3.5 |
| TX-14 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 2.6 |
| TX-15 | <i>Bacillus sp.</i> | 3.1 |
| TX-16 | <i>Serratia rubidae</i> | 2.2 |
| TX-17 | <i>Serratia rubidae</i> | 2.5 |
| TX-18 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | 2.0 |
| TX-19 | <i>Serratia rubidae</i> | 1.3 |
| TX-20 | <i>Pseudomonas cepacia</i> | 1.8 |
| TX-21 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 3.9 |
| TX-22 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | 2.4 |
| TX-23 | <i>Hafnia alvei</i> | 0.5 |
| TX-24 | <i>Bacillus sp.</i> | 0.5 |
| TX-25 | <i>Serratia rubidae</i> | 0.6 |
| TX-26 | <i>Pseudomonas cepacia</i> | 0.9 |
| TX-27 | <i>Serratia rubidae</i> | 1.4 |
| TX-28 | <i>Pseudomonas cepacia</i> | 0.2 |
| TX-29 | <i>Hafnia alvei</i> | 1.0 |
| TX-30 | <i>Bacillus sp.</i> | 1.1 |
| TX-31 | <i>Serratia rubidae</i> | 0.7 |
| TX-32 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2.3 |
| TX-33 | <i>Micrococcus sp.</i> | 1.3 |
| T2X-1 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 3.7 |
| T2X-2 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | 3.1 |
| T2X-3 | <i>Pseudomona cepacia</i> | 2.3 |
| T2X-4 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2.1 |
| T2X-5 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2.7 |
| T2X-6 | <i>Hafnia alvei</i> | 1.3 |
| T2X-7 | <i>Bacillus sp.</i> | 1.8 |
| T2X-8 | <i>Serratia rubidae</i> | 3.3 |
| T2X-9 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2.4 |
| T2X-10 | <i>Hafnia alvei</i> | 0.9 |
| T2X-11 | <i>Bacillus sp.</i> | 0.5 |
| T2X-12 | <i>Bacillus sp.</i> | 0.6 |
| T2X-13 | <i>Serratia rubidae</i> | 0.9 |
| T2X-14 | <i>Serratia rubidae</i> | 1.8 |
| T2X-15 | <i>Citrobacter freundii</i> | 0.2 |
| T2X-16 | <i>Acinetobacter aureofasciens</i> | 3.2 |
| T2X-17 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | 3.1 |
| T2X-18 | <i>Pseudomona cepacia</i> | 2.2 |
| T2X-19 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2.5 |
| T2X-20 | <i>Staphylococcus sp.</i> | 2.6 |
| T2X-21 | <i>Hafnia alvei</i> | 1.4 |
| T2X-22 | <i>Listonella damsela</i> | 0.6 |
| T2X-23 | <i>Bacillus sp.</i> | 3.5 |
| T2X-24 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | 3.1 |
| T2X-25 | <i>Bacillus sp.</i> | 2.2 |

4.4. ACTIVIDAD DEGRADATIVA DE LAS CEPAS BACTERIANAS

La actividad degradativa se determinó por el grado de turbidez según la escala de Mc Farland (Mills y col. 1978).

CUADRO Nº 4. Actividad degradativa de las cepas bacterianas aisladas

| CEPAS | ESPECIE | ACTIVIDAD DEGRADATIVA |
|--------|------------------------------------|-----------------------|
| TX-1 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ++ |
| TX-2 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ++ |
| TX-3 | <i>Pseudomonas cepacia</i> | ++ |
| TX-4 | <i>Bacillus sp.</i> | +++ |
| TX-5 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | +++ |
| TX-6 | <i>Pseudomonas cepacia</i> | + |
| TX-7 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | ++ |
| TX-8 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | + |
| TX-9 | <i>Pseudomona cepacia</i> | ++ |
| TX-10 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ++ |
| TX-11 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ++ |
| TX-12 | <i>Hafnia alvei</i> | +++ |
| TX-13 | <i>Bacillus sp.</i> | ++ |
| TX-14 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | ++ |
| TX-15 | <i>Bacillus sp.</i> | + |
| TX-16 | <i>Serratia rubidae</i> | ++ |
| TX-17 | <i>Serratia rubidae</i> | + |
| TX-18 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | ++ |
| TX-19 | <i>Serratia rubidae</i> | +++ |
| TX-20 | <i>Pseudomonas cepacia</i> | ++ |
| TX-21 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | ++ |
| TX-22 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | +++ |
| TX-23 | <i>Hafnia alvei</i> | +++ |
| TX-24 | <i>Bacillus sp.</i> | ++ |
| TX-25 | <i>Serratia rubidae</i> | ++ |
| TX-26 | <i>Pseudomonas cepacia</i> | ++ |
| TX-27 | <i>Serratia rubidae</i> | ++ |
| TX-28 | <i>Pseudomonas cepacia</i> | ++ |
| TX-29 | <i>Hafnia alvei</i> | + |
| TX-30 | <i>Bacillus sp.</i> | + |
| TX-31 | <i>Serratia rubidae</i> | ++ |
| TX-32 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | + |
| TX-33 | <i>Micrococcus sp.</i> | + |
| T2X-1 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | +++ |
| T2X-2 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | ++ |
| T2X-3 | <i>Pseudomona cepacia</i> | ++ |
| T2X-4 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ++ |
| T2X-5 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ++ |
| T2X-6 | <i>Hafnia alvei</i> | ++ |
| T2X-7 | <i>Bacillus sp.</i> | + |
| T2X-8 | <i>Serratia rubidae</i> | ++ |
| T2X-9 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ++ |
| T2X-10 | <i>Hafnia alvei</i> | ++ |
| T2X-11 | <i>Bacillus sp.</i> | +++ |
| T2X-12 | <i>Bacillus sp.</i> | ++ |
| T2X-13 | <i>Serratia rubidae</i> | ++ |

| | | |
|--------|------------------------------------|-----|
| T2X-14 | <i>Serratia rubidae</i> | ++ |
| T2X-15 | <i>Citrobacter freundii</i> | ++ |
| T2X-16 | <i>Acinetobacter aureofasciens</i> | + |
| T2X-17 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | ++ |
| T2X-18 | <i>Pseudomona cepacia</i> | +++ |
| T2X-19 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | +++ |
| T2X-20 | <i>Staphylococcus</i> | ++ |
| T2X-21 | <i>Hafnia alvei</i> | + |
| T2X-22 | <i>Listonella damsela.</i> | ++ |
| T2X-23 | <i>Bacillus sp.</i> | ++ |
| T2X-24 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | ++ |
| T2X-25 | <i>Bacillus sp.</i> | +++ |

4.5. SELECCIÓN DEL CONSORCIO BACTERIANO

El criterio para la selección del consorcio bacteriano se basó en la capacidad biodegradativa y emulsificante de las bacterias aisladas; las cepas que conformaron el consorcio bacteriano fueron:

- *Pseudomonas aeruginosa* TX-5
- *Acinetobacter calcoaceticus* T2X-1
- *Bacillus sp.* TX-4

CUADRO Nº 5. Actividad emulsificante, actividad degradativa y población inicial bioaumentada del consorcio bacteriano seleccionado

| ESPECIE | ACTIVIDAD EMULSIFICANTE | ACTIVIDAD DEGRADATIVA | POBLACIÓN INICIAL (bacterias/ml) |
|------------------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4.9 | +++ | 4.7×10^{10} |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 3.7 | +++ | 2.9×10^{10} |
| <i>Bacillus sp</i> | 3.8 | +++ | 3.1×10^{10} |

Las cepas descritas en este cuadro son las que tuvieron mayor capacidad degradativa y emulsificante, con respecto a todas las cepas aisladas, por lo tanto fueron seleccionadas para conformar el consorcio del experimento.

4.6. BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

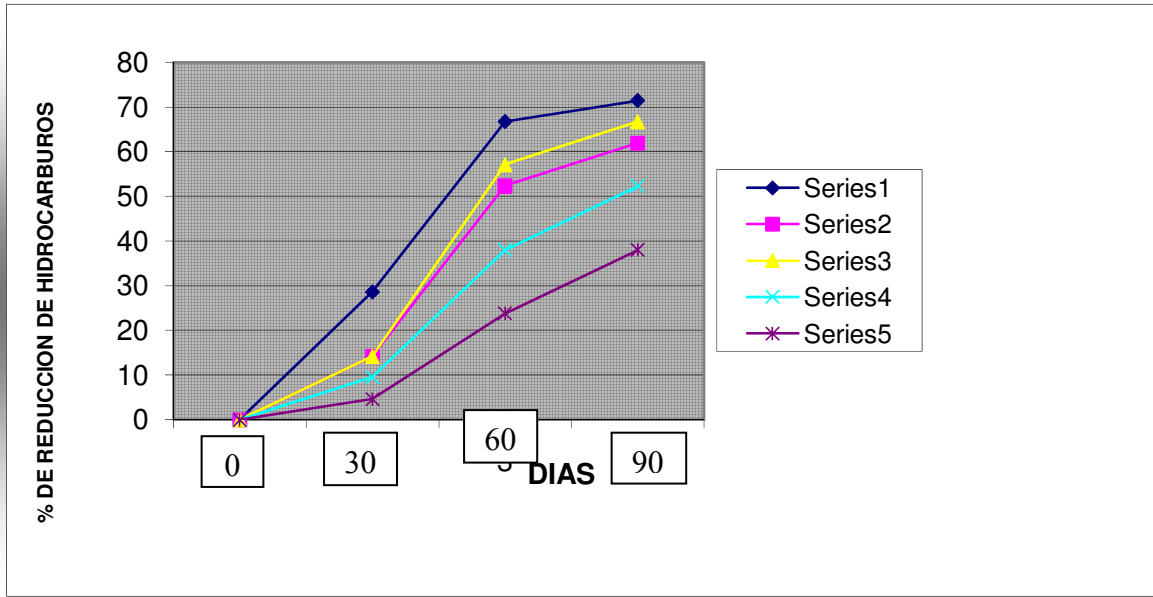
Durante el desarrollo del experimento de 90 días, se observó un mayor desarrollo poblacional a los 30 días, que conllevó a la degradación de hidrocarburos .

CUADRO Nº 6. Población bacteriana heterótrofa y oleofílica durante el proceso de experimentación (0-90 días)

| TIEMPO (Días) | B+F | | B-F | | N+F | | N-F | | CA | |
|---------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Bact. Oleofil. | Bact. Heterot | Bact. Oleofil. | Bact. Heterot | Bact. Oleofil. | Bact. Heterot | Bact. Oleofil. | Bact. Heterot | Bact. Oleofil. | Bact. Heterot |
| 0 | 6.7x10 ¹⁰ | 2.2x10 ⁴ | 2.9x10 ¹⁰ | 2.0x10 ⁴ | 4.9x10 ³ | 3.7x10 ⁵ | 3.1x10 ² | 2.4x10 ⁵ | 2.5x10 ³ | 3.0x10 ⁴ |
| 30 | 4.5x10 ¹¹ | 6.4x10 ⁵ | 9.8x10 ¹⁰ | 1.7x10 ⁶ | 5.9x10 ⁷ | 3.8x10 ⁶ | 2.1x10 ⁶ | 6.7x10 ⁶ | 0 | 0 |
| 60 | 2.1x10 ⁹ | 2.1x10 ⁵ | 3.4x10 ⁸ | 2.1x10 ⁵ | 2.1x10 ⁶ | 2.1x10 ⁴ | 2.1x10 ⁴ | 2.1x10 ⁴ | 0 | 0 |
| 90 | 2.1x10 ⁸ | 2.1x10 ⁴ | 2.1x10 ⁵ | 2.1x10 ⁴ | 2.1x10 ⁴ | 1.1x10 ⁴ | 2.1x10 ³ | 2.1x10 ³ | 0 | 0 |

CUADRO Nº 7. Reducción total de hidrocarburos en los terrarios de experimentación

| TIEMPO (Días) | B+F | | B-F | | N+F | | N-F | | CA | |
|---------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|-------------------|
| | Hidroc. g/25g | % reduc. de hidroc. | Hidroc. g/25g | % reduc. de hidroc. | Hidroc. g/25g | % reduc. de hidroc. | Hidroc. g/25g | % Reduc. de hidroc. | Hidroc. g/25g | % reduc de hidroc |
| 0 | 2.1 | 0 | 2.1 | 0 | 2.1 | 0 | 2.1 | 0 | 2.1 | 0 |
| 30 | 1.5 | 38.6 | 1.8 | 29.2 | 1.8 | 34.2 | 1.9 | 19.5 | 2.0 | 14.7 |
| 60 | 0.7 | 66.7 | 1.0 | 52.3 | 0.9 | 57.1 | 1.3 | 38.0 | 1.6 | 23.8 |
| 90 | 0.6 | 71.4 | 0.8 | 61.9 | 0.7 | 66.7 | 1.0 | 52.3 | 1.3 | 28.0 |



Serie 1: B+F, serie 2: B-F, serie 3: N+F, serie 4: N-F, serie 5: CA

GRÁFICO N° 3. Porcentaje de reducción de hidrocarburos durante los 90 días de experimentación

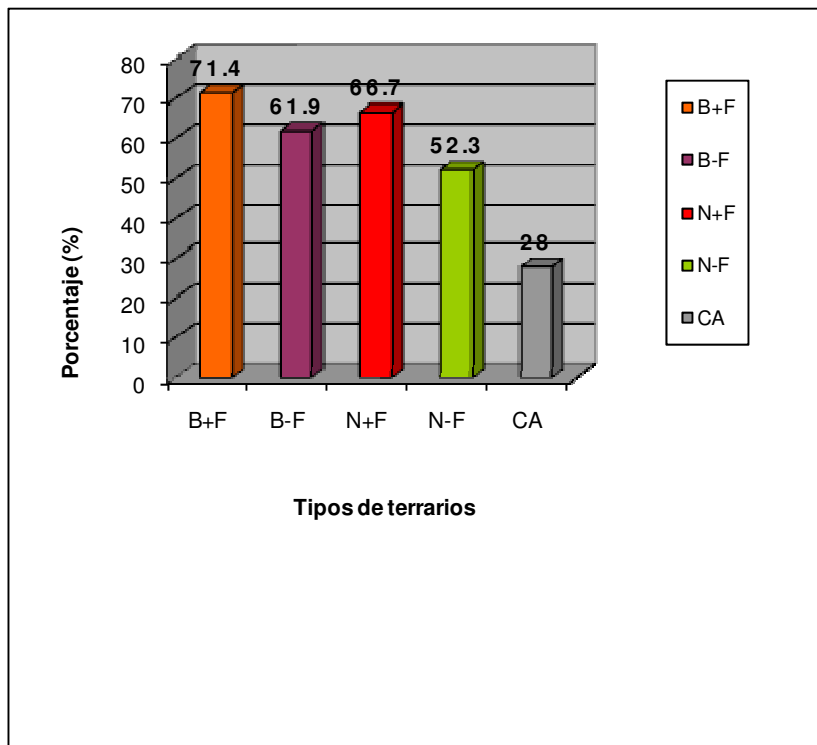


GRÁFICO N° 4. Porcentaje de reducción de hidrocarburos

en los terrarios al final de experimento

4.7. ANÁLISIS DE TERRARIOS UTILIZADOS DURANTE LA EXPERIMENTACIÓN

CUADRO N° 8 . Caracterización de los suelos de los cinco terrarios a los 30 días

| MUESTRA | pH | H.d. % | M.O. % | N total % | P disp. ppm | K disp. ppm |
|----------------|-----------|-------------------|-------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| I-B+F | 8.0 | 45.82 | 5,3 | 0,15 | 36,55 | 1234 |
| I-B-F | 8.0 | 43.19 | 6,0 | 0,16 | 51,11 | 849 |
| I-N+F | 8.0 | 48.19 | 8,5 | 0,15 | 43,02 | 982 |
| I-N-F | 8.0 | 51.09 | 6,0 | 0,12 | 17,00 | 634 |
| I-CA | 7.0 | 38.65 | 6,6 | 0,11 | 18,83 | 1047 |

CUADRO N° 9. Caracterización de los suelos de los cinco terrarios a los 60 días

| MUESTRA | pH | H.d. % | M.O. % | N total % | P disp. ppm | K disp. ppm |
|----------------|-----------|-------------------|-------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| II-B+F | 7,2 | 44.44 | 6,0 | 0,14 | 35,7 | 472 |
| II-B-F | 7,5 | 42.33 | 5,4 | 0,11 | 41,8 | 189 |
| II-N+F | 7,4 | 42.68 | 5,4 | 0,14 | 28,3 | 721 |
| II-N-F | 7,5 | 45.51 | 4,2 | 0,12 | 20,1 | 605 |
| II-CA | 6,8 | 39.90 | 5,3 | 0,10 | 16,40 | 987 |

CUADRO N° 10. Caracterización de los suelos de los cinco terrarios a los 90 días

| MUESTRA | pH | H.d. % | M.O. % | N total % | P disp. ppm | K disp. ppm |
|---------|-----|-----------|-----------|-----------------|-------------------|-------------------|
| III-B+F | 7.0 | 42.33 | 5.9 | 0.12 | 30.2 | 399 |
| II-B-F | 7.2 | 41.40 | 5.3 | 0.90 | 40.7 | 180 |
| III-N+F | 7.4 | 42.00 | 5.4 | 0.11 | 25.5 | 657 |
| III-N-F | 7.3 | 45.00 | 4.4 | 0.10 | 12.3 | 621 |
| III-CA | 6.7 | 39.60 | 5.0 | 0.80 | 13.9 | 869 |

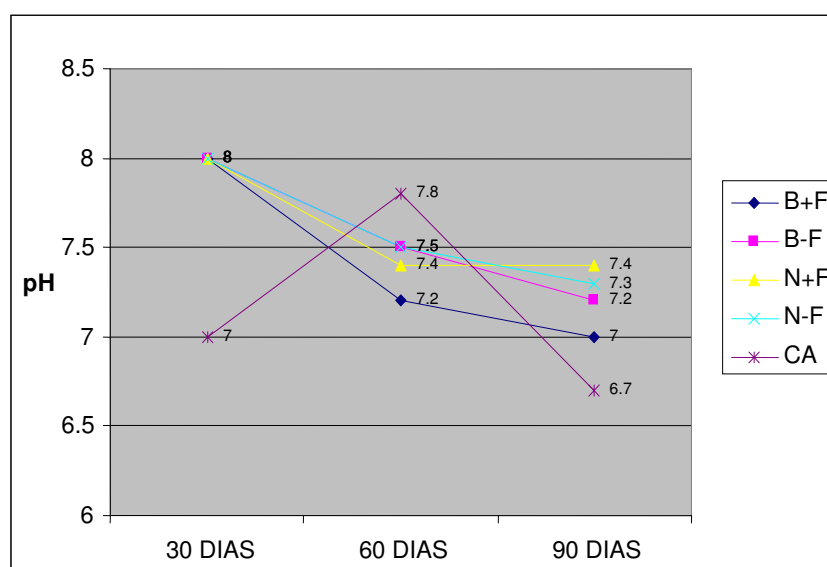


GRÁFICO N° 5. Variación del pH en los terrarios con relación al tiempo de experimentación

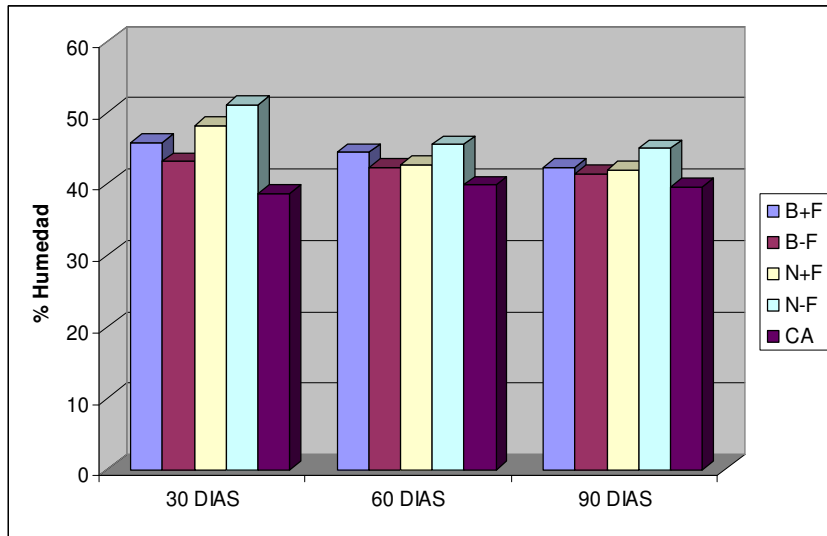


GRÁFICO N° 6. Variación de la Humedad (%) en los terrarios con relación al tiempo de experimentación

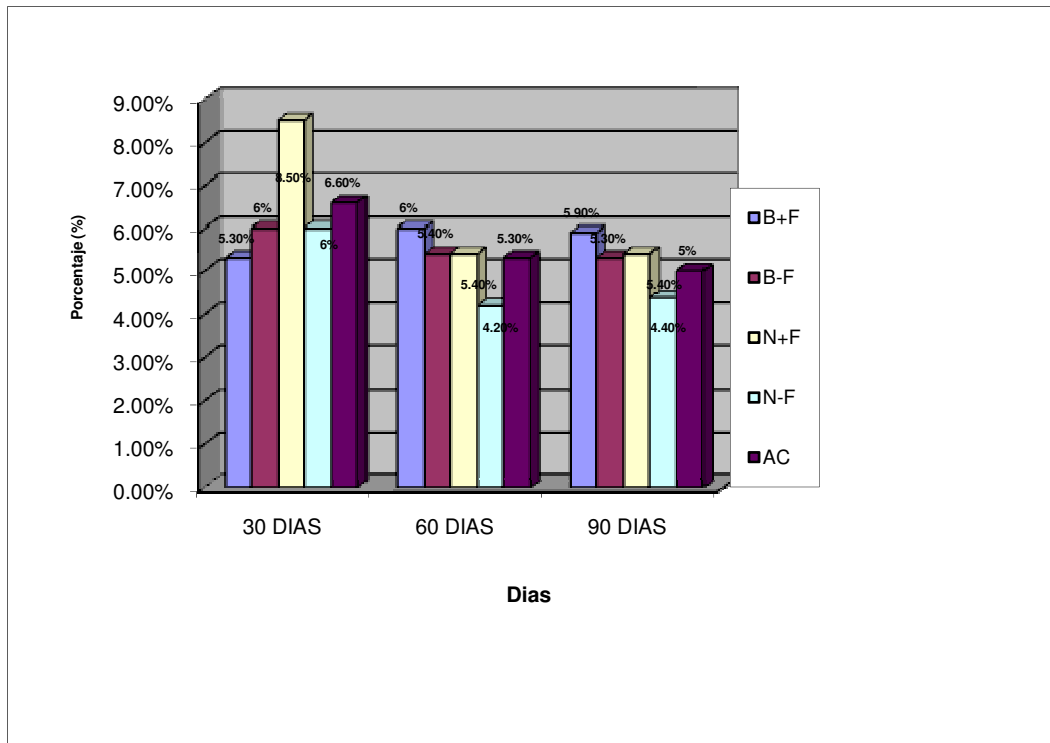


GRAFICO N° 7. Variación de la Materia orgánica (%) en los terrarios con relación al tiempo de experimentación.

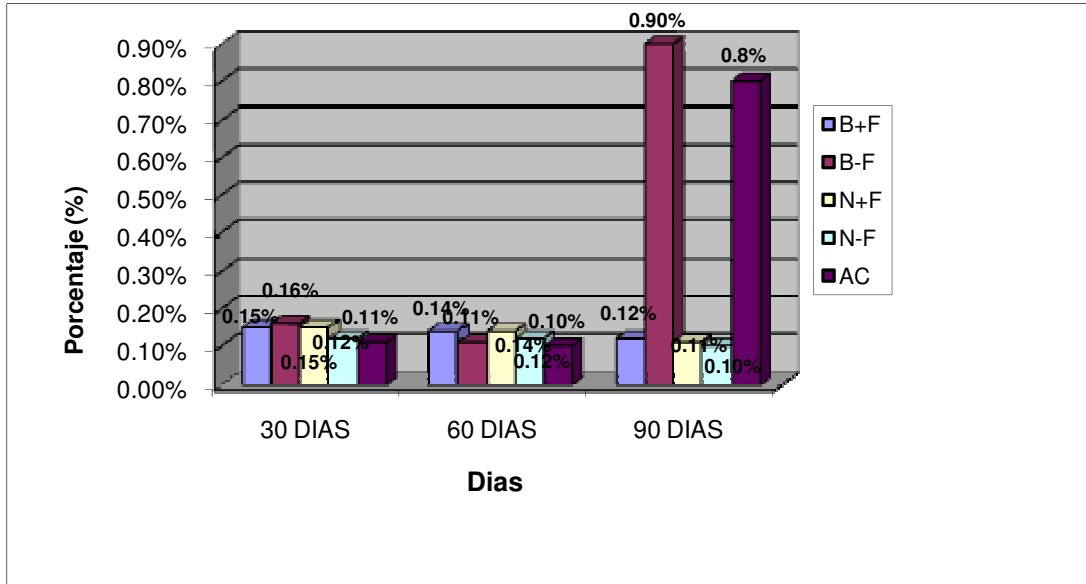


GRÁFICO N° 8. Variación de Nitrógeno (%) en los terrarios con relación al tiempo de experimentación

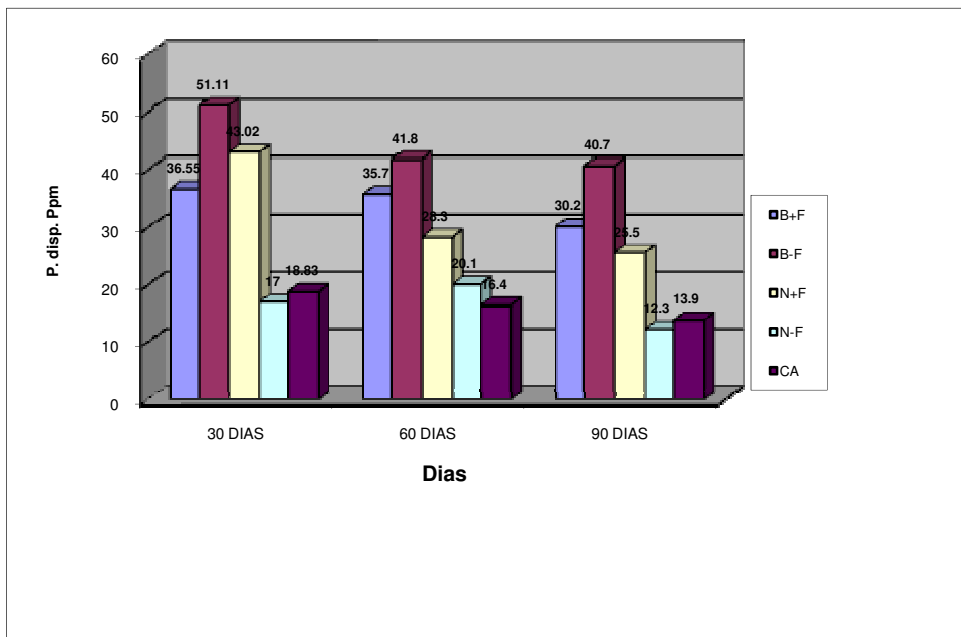


GRÁFICO N° 9. Variación del Fósforo (ppm) en los terrarios con relación al tiempo de experimentación

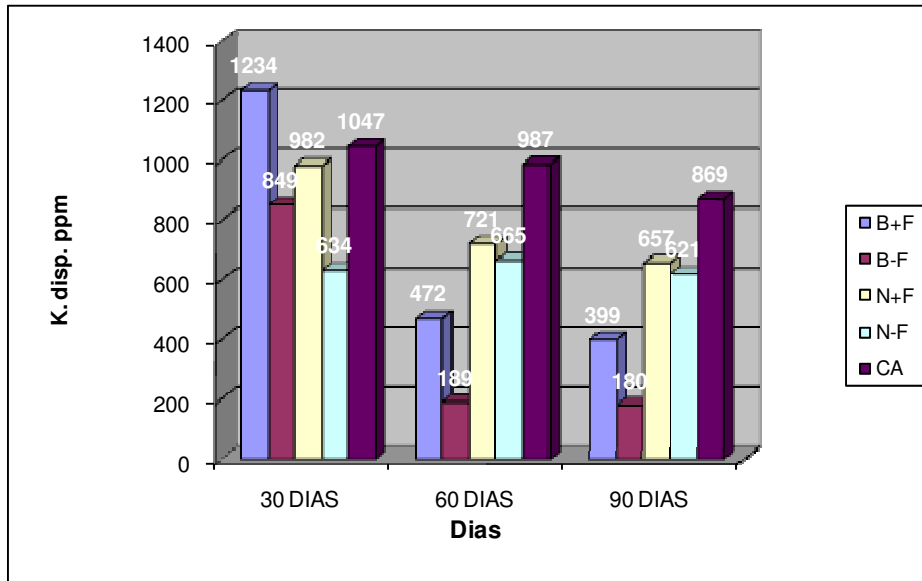


GRÁFICO N° 10. Variación del Potasio (ppm) en los terrarios con relación al tiempo de experimentación

CUADRO N° 11. Temperatura de los terrarios durante el tiempo de experimentación

La temperatura (°C) de los terrarios fue medida cada 15 días en un total de 90 días como se observa en el cuadro.

| DÍAS | TEMPERATURA (°C) | | | | |
|------|------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| | Terrario B+F | Terrario B-F | Terrario N+F | Terrario N-F | Terrario CA |
| | | | | | |

| | | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0 | 24,80 | 26,00 | 24,78 | 24,22 | 25,30 |
| 15 | 25,80 | 26,90 | 25,40 | 24,90 | 26,90 |
| 30 | 26,20 | 27,30 | 26,50 | 25,30 | 26,40 |
| 45 | 24,51 | 24,72 | 24,12 | 24,53 | 25,52 |
| 60 | 23,22 | 23,92 | 23,32 | 23,12 | 21,52 |
| 75 | 19,80 | 19,40 | 19,40 | 21,80 | 20,00 |
| 90 | 19,60 | 19,00 | 18,90 | 20,60 | 19,80 |

4.8. ANÁLISIS DEL CRUDO DE PETRÓLEO

CUADRO Nº 12. Características del destilado del crudo de petróleo al término del experimento.

| Nº | COMPONENTES | PM | FORMULA | % |
|----|--------------------|-----|---------------------------------|-------|
| 1 | n-pentano | 76 | C ₅ H ₁₂ | 0.00 |
| 2 | n-hexano | 86 | C ₆ H ₁₄ | 0.00 |
| 3 | n-heptano | 100 | C ₇ H ₁₆ | 0.00 |
| 4 | 2 metil pentano | 72 | C ₆ H ₁₄ | 0.45 |
| 5 | 3 metil hexano | 100 | C ₇ H ₁₄ | 0.89 |
| 6 | 1,1,2 trimetil | 126 | C ₉ H ₂₈ | 1.28 |
| 7 | ciclohexano | 84 | C ₆ H ₁₂ | 1.67 |
| 8 | 1-hexeno | 86 | C ₇ H ₁₆ | 1.76 |
| 9 | 2 metil hexano | 114 | C ₈ H ₁₈ | 6.58 |
| 10 | 2 etil hexano | 114 | C ₁₁ H ₂₄ | 7.52 |
| 11 | 2 metil decano | 156 | C ₁₂ H ₂₆ | 0.38 |
| 12 | 4 metil decano | 128 | C ₉ H ₂₀ | 11.17 |
| 13 | n-nonano | 170 | C ₁₂ H ₂₆ | 5.05 |
| 14 | 2 metil undecano | 142 | C ₁₀ H ₂₂ | 9.00 |
| 15 | 3,5 dimetil octano | 170 | C ₁₂ H ₂₆ | 2.15 |
| 16 | 2 metil undecano | 170 | C ₁₂ H ₂₆ | 7.56 |
| 17 | dodecano | 184 | C ₁₃ H ₂₈ | 7.80 |
| 18 | n-tridecano | 198 | C ₁₄ H ₃₀ | 5.03 |
| 19 | n-tetradecano | 198 | C ₁₄ H ₃₀ | 3.48 |
| 20 | tetradecano | 198 | C ₁₄ H ₃₀ | 3.60 |
| 21 | 2 metil tridecano | 212 | C ₁₅ H ₃₂ | 3.70 |
| 22 | n-pentadecano | 212 | C ₁₅ H ₃₂ | 1.23 |
| 23 | pentadecano | 226 | C ₁₆ H ₃₄ | 1.20 |
| 24 | n-hexadecano | 240 | C ₁₇ H ₃₆ | 0.91 |
| 25 | n-heptadecano | 254 | C ₁₈ H ₃₈ | 0.80 |
| 26 | n-octadecano | 254 | C ₁₈ H ₃₈ | 0.76 |
| 27 | octadecano | 282 | C ₂₀ H ₄₂ | 0.71 |
| 28 | n-eicosano | 296 | C ₂₁ H ₄₄ | 0.55 |
| 29 | n-henicosano | 310 | C ₂₂ H ₄₆ | 0.43 |
| 30 | n-dodocosano | 352 | C ₂₅ H ₅₂ | 0.37 |

| | | | | |
|----|---------------|-----|---------------------------------|------|
| 31 | n-pentacosano | 394 | C ₂₈ H ₅₈ | 0.15 |
| 32 | n-octacosano | 408 | C ₂₉ H ₆₀ | 0.19 |
| 33 | n-nonacosano | 422 | C ₃₀ H ₆₂ | 0.20 |
| 34 | n-triacontano | 450 | C ₃₂ H ₆₆ | 0.10 |

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN TOTAL DE HIDROCARBUROS

Se ha realizado el análisis estadístico de la información respecto a la reducción total de hidrocarburos en los terrarios de experimentación. La información ha sido registrada a 30, 60 y 90 días y que se trata de un conjunto de datos de medidas repetidas.

El análisis a realizarse, implica la evaluación conjunta de los porcentajes de reducción en los cinco tratamientos a través de los 90 días. En el siguiente cuadro, se presenta la prueba **multivariada de Wilks**, que permite evaluar si existen diferencias significativas en los tratamientos, en lo que respecta al porcentaje de reducción total de hidrocarburos, a través del tiempo.

Se puede concluir con un nivel de significación del 5%, que la reducción total de hidrocarburos es diferente, a través del tiempo observado.

Prueba multivariada de Wilks

| Efecto | Valor | Estadística | Hipótesis | Error | Nivel de significación |
|----------------------------|--------|-------------|-----------|-------|------------------------|
| Reducción | 0,0054 | 371,44 | 2 | 4 | 0,0000 |
| Reducción por tratamientos | 0,0066 | 11,32 | 8 | 8 | 0,0012 |

Esto justifica el ajuste de recta en cada uno de los tratamientos para determinar las diferencias entre pares de tratamientos. En el siguiente gráfico se puede observar que la reducción de hidrocarburos en el tratamiento CA es constante en el tiempo (no existe cambios significativos en la reducción), a diferencia de los otros tratamientos, donde el tratamiento, **B+F** registra los *mayores porcentajes de reducción de hidrocarburos*. No existe diferencias significativas entre los tratamientos B-F y N+F y el tratamiento N-F donde se observa los menores porcentajes de reducción, sin considerar el tratamiento CA.

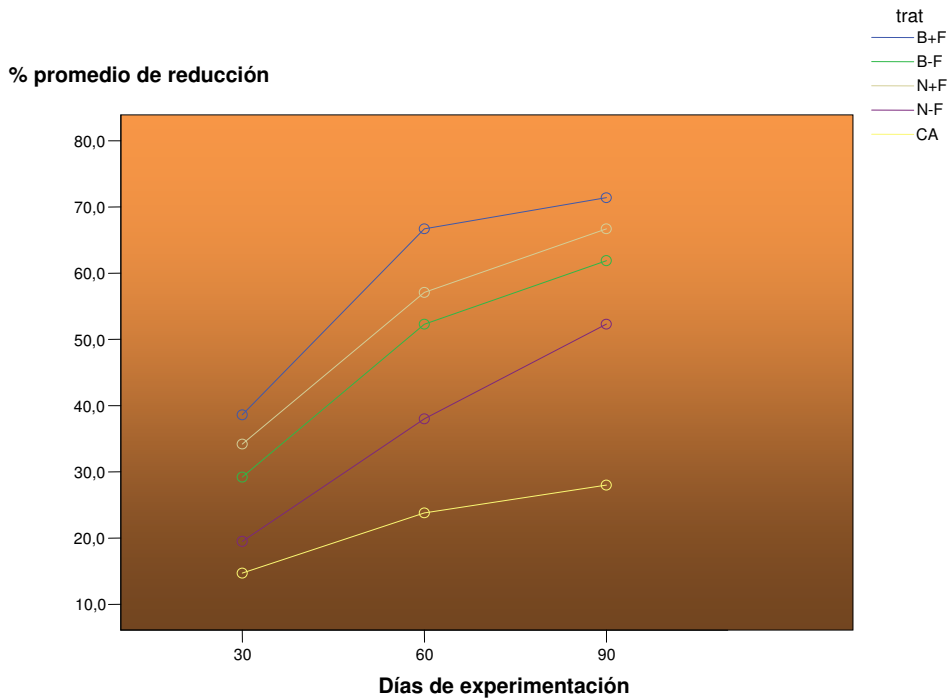


GRÁFICO N° 11. Biodegradación de hidrocarburos (%) en 90 días de experimentación

Determinación de la relación entre la biodegradación del terrario B+F (Hidroc. g/ 25 g.) con respecto al tiempo.

Una manera muy usual de establecer o estudiar la relación entre la reducción de hidrocarburos en gramos con respecto al tiempo es utilizando en el modelo de regresión: $Y= a+bx+c$

X: Variable Independiente (Tiempo en días)

Y: Variable Dependiente (B+F Hidroc. g/25g)

Resumen del modelo

| Modelo | R | R cuadrado | R cuadrado corregida | Error típ. de la estimación |
|--------|-------------------|------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | .965 ^a | .932 | .898 | .2269 |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

Este cuadro da a conocer el resumen del modelo, donde el coeficiente de correlación de 0.965, e indica la existencia de un 96.5 % de relación entre la variables Tiempo (Días) y B + F (Hidroc. g/25g).

ANOVA^b

| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------|-----------|-------------------|----|------------------|--------|-------------------|
| 1 | Regresión | 1.405 | 1 | 1.405 | 27.272 | .035 ^a |
| | Residual | .103 | 2 | 5.150E-02 | | |
| | Total | 1.507 | 3 | | | |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

b. Variable dependiente: B + F (Hidroc. g/25g)

Mediante el ANOVA, es posible dar a conocer la validez del modelo según este cuadro, se rechaza la hipótesis nula a que los coeficientes del modelo de regresión lineal son nulos y por tanto los coeficientes del modelo son altamente significativos en un 95% en el modelo de la regresión lineal de las variables tiempo en días y B+F (Hidroc.g/25g), ya que el valor de Sig. es menor a 0.05, asociado a la prueba F.

Entonces se concluye que la Biodegradación de B+F (Hidroc. g/25g) es influida significativamente por el tiempo medido en días, es decir que a mayor tiempo, existe mayor biodegradación.

Coefficientes^a

| Modelo | | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | t | Sig. |
|--------|---------------|--------------------------------|------------|-----------------------------|--------|------|
| | | B | Error típ. | Beta | | |
| 1 | (Constante) | 2.020 | .190 | | 10.639 | .009 |
| | Tiempo (Días) | -1.77E-02 | .003 | -.965 | -5.222 | .035 |

a. Variable dependiente: B + F (Hidroc. g/25g)

Este cuadro muestra los valores de los coeficientes del modelo de regresión lineal, donde la constante es de 2.02 y el coeficiente para la variable tiempo en días es de -0.0177; es decir, el modelo está dado por $Y=2.02-0.0177X$. Se utiliza la prueba t de student, donde se rechaza la hipótesis nula en que el coeficiente para la constante es nula y por tanto, es altamente significativa para el modelo de regresión lineal, ya que el valor de Sig. es menor a 0.05; así también el valor del coeficiente para el tiempo en días.

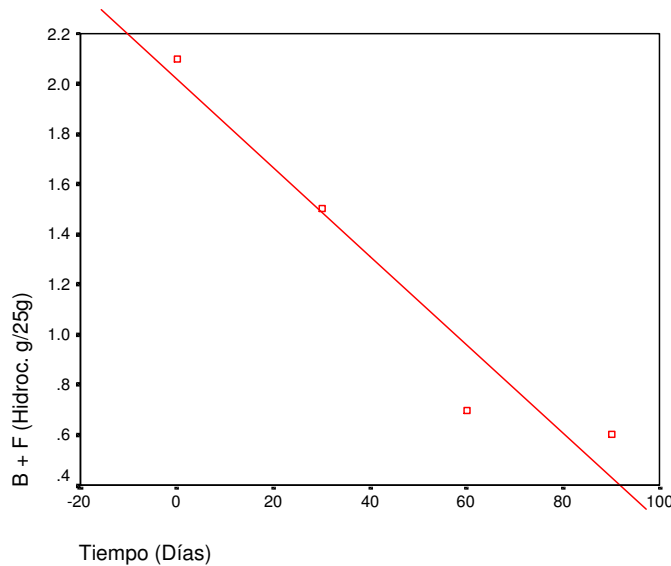


GRÁFICO N° 12. Relación de la Biodegradación del terrario B+F (Hidroc. g/ 25 g) con respecto al tiempo según modelo de regresión lineal

La recta que se muestra en el gráfico, es la gráfica del modelo de regresión dado por $Y=2.02-0.0177X$.

Determinación de la relación entre la biodegradación del terrario B+F en porcentaje (%) con respecto al tiempo.

Para establecer o estudiar la relación entre la reducción de hidrocarburos en porcentaje con respecto al tiempo es utilizando en el modelo de regresión: $Y = a + bx + c$

X: Variable Independiente (Tiempo en días)

Y: Variable Dependiente (B+F Porcentaje)

Resumen del modelo

| Modelo | R | R cuadrado | R cuadrado corregida | Error típ. de la estimación |
|--------|-------------------|------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | .953 ^a | .909 | .863 | 12.1578 |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

Este cuadro da a conocer el resumen del modelo, donde el coeficiente de correlación de 0.953, e indica la existencia de un 95.3 % de relación entre la variables Tiempo (Días) y B + F (Porcentaje).

ANOVA^b

| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------|-----------|-------------------|----|------------------|--------|-------------------|
| 1 | Regresión | 2935.465 | 1 | 2935.465 | 19.860 | .047 ^a |
| | Residual | 295.623 | 2 | 147.811 | | |
| | Total | 3231.088 | 3 | | | |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

b. Variable dependiente: B + F Porcentaje

Este Cuadro, da a conocer la validez del modelo, a través del análisis de Varianza de los coeficientes del modelo; según este cuadro, se rechaza la hipótesis nula que los coeficientes del modelo de regresión lineal son nulos y por tanto los coeficientes del modelo son altamente significativos en un 95% en el modelo de la regresión lineal de las variables tiempo en días y B+F Porcentaje, ya que la el valor de Sig. es menor a 0.05, asociado a la prueba F.

Entonces se concluye que la Biodegradación de B+F en porcentaje, es influida significativamente por el tiempo medido en días, es decir, que a mayor tiempo, existe menor porcentaje de hidrocarburos en el terrario estudiado.

Coefficientes^a

| Modelo | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | t | Sig. |
|---------------|--------------------------------|------------|-----------------------------|-------|------|
| | B | Error típ. | Beta | | |
| 1 (Constante) | 7.830 | 10.172 | | .770 | .522 |
| Tiempo (Días) | .808 | .181 | .953 | 4.456 | .047 |

a. Variable dependiente: B + F Porcentaje

Este cuadro muestra los valores de los coeficientes del modelo de regresión lineal, donde la constante es de 7.83 y el coeficiente para la variable tiempo en días, es de 0.808; es decir, el modelo está dado por $Y=7.83+0.808X$. Además, este cuadro muestra la asociación de los coeficientes del modelo con la prueba t de student, donde se rechaza la hipótesis nula en que el coeficiente para la constante es nula y por tanto es altamente significativa para el modelo de regresión lineal, ya que el valor de Sig. es menor a 0.05; así también el valor del coeficiente para el tiempo en días.

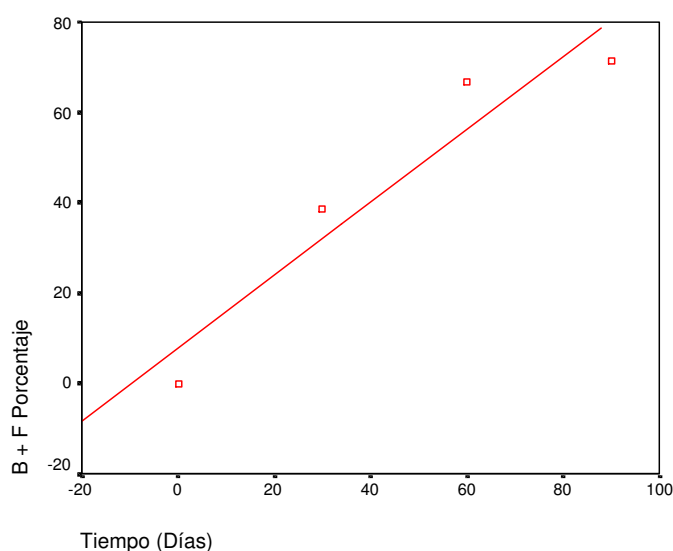


GRÁFICO N° 13. Relación de la Biodegradación del terrario B+F (porcentaje) con respecto al tiempo según modelo de regresión lineal

La recta que se muestra en el gráfico, es la gráfica del modelo de regresión dado por $Y=7.83+0.808X$.

Determinación de la relación entre la biodegradación del terrario B-F (Hidroc. g/ 25 g.) con respecto al tiempo.

Para establecer o estudiar la relación entre la reducción de hidrocarburos en gramos con respecto al tiempo, se utiliza en el modelo de regresión: $Y = a + bx + c$

X: Variable Independiente (Tiempo en días)

Y: Variable Dependiente (B-F Hidroc. g/25g)

Resumen del modelo

| Modelo | R | R cuadrado | R cuadrado corregida | Error típ. de la estimación |
|--------|-------------------|------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | .973 ^a | .946 | .919 | .1775 |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

Este cuadro da a conocer el resumen del modelo, donde el coeficiente de correlación de 0.973, e indica la existencia de un 97.3 % de relación entre la variables Tiempo (Días) y B - F (Hidroc. g/25g).

ANOVA

| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------|-----------|-------------------|----|------------------|--------|-------------------|
| 1 | Regresión | 1.105 | 1 | 1.105 | 35.063 | .027 ^a |
| | Residual | 6.300E-02 | 2 | 3.150E-02 | | |
| | Total | 1.168 | 3 | | | |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

b. Variable dependiente: B - F (Hidroc. g/25g)

Este cuadro, da a conocer la validez del modelo a través del análisis de Varianza de los coeficientes del modelo; según este cuadro, se rechaza la hipótesis nula que los coeficientes del modelo de regresión lineal son nulos y por tanto, los coeficientes del modelo son altamente significativos en un 95% en el modelo de la regresión lineal de las variables tiempo en días y B-F Porcentaje, ya que la el valor de Sig. es menor a 0.05, asociado a la prueba F.

Entonces se concluye que la Biodegradación de B-F (g/25g) es influida significativamente por el tiempo medido en días, es decir que a mayor tiempo, existe menor porcentaje de hidrocarburos en el terrario estudiado.

Coefficientes^a

| Modelo | | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | t | Sig. |
|--------|---------------|--------------------------------|------------|-----------------------------|--------|------|
| | | B | Error típ. | Beta | | |
| 1 | (Constante) | 2.130 | .148 | | 14.344 | .005 |
| | Tiempo (Días) | -1.57E-02 | .003 | -.973 | -5.921 | .027 |

a. Variable dependiente: B - F (Hidroc. g/25g)

Este cuadro muestra los valores de los coeficientes del modelo de regresión lineal, donde la constante es de 2.13 y el coeficiente para la variable tiempo en días, es de -0.0157; es decir, el modelo está dado por $Y=2.13-0.0157X$. Además, este cuadro muestra la asociación de los coeficientes del modelo con la prueba t de student, donde se rechaza la hipótesis nula en que el coeficiente para la constante es nula y por tanto, es altamente significativa para el modelo de regresión lineal, ya que el valor de Sig. es menor a 0.05; así también el valor del coeficiente para el tiempo en días.

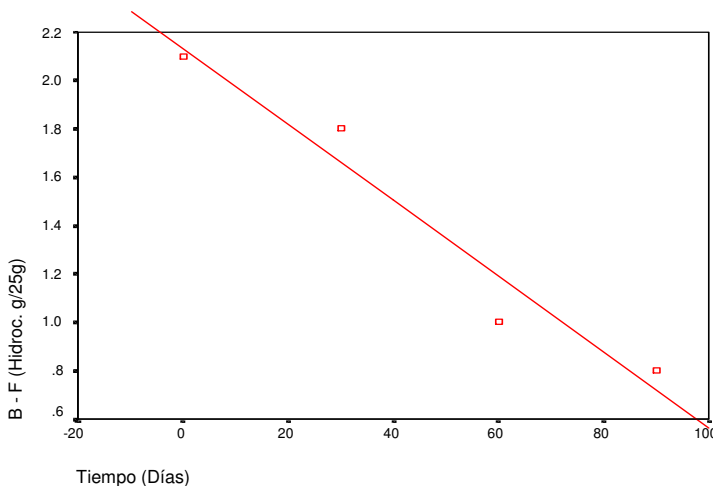


GRÁFICO N° 14. Relación de la Biodegradación del terrario B-F (Hidroc. g/ 25 g) con respecto al tiempo según modelo de regresión lineal

La recta que se muestra en el gráfico, es la gráfica del modelo de regresión, dado por $Y=2.13-0.0157X$.

Determinación de la relación entre la biodegradación del terrario B-F en porcentaje (%) con respecto al tiempo.

Para establecer o estudiar la relación entre la reducción de hidrocarburos en porcentaje con respecto al tiempo es utilizando en el modelo de regresión: $Y = a + bx + c$

X: Variable Independiente (Tiempo en días)

Y: Variable Dependiente (B-F Porcentaje)

Resumen del modelo

| Modelo | R | R cuadrado | R cuadrado corregida | Error típ. de la estimación |
|--------|-------------------|------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | .978 ^a | .957 | .935 | 7.0277 |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

Este cuadro da a conocer el resumen del modelo, donde el coeficiente de correlación de 0.978, e indica la existencia de un 97,8 % de relación entre la variables Tiempo (Días) y B - F (Porcentaje).

ANOVA^b

| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------|-----------|-------------------|----|------------------|--------|-------------------|
| 1 | Regresión | 2179.872 | 1 | 2179.872 | 44.137 | .022 ^a |
| | Residual | 98.778 | 2 | 49.389 | | |
| | Total | 2278.650 | 3 | | | |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

b. Variable dependiente: B - F Porcentaje

Este Cuadro, da a conocer la validez del modelo a través del análisis de Varianza de los coeficientes del modelo; según este cuadro, se rechaza la hipótesis nula a que los coeficientes del modelo de regresión lineal son nulos y por tanto los coeficientes del modelo son altamente significativos en un 95% en el modelo de la regresión lineal de las variables tiempo en días y B-F Porcentaje, ya que la el valor de Sig. es menor a 0.05, asociado a la prueba F.

Entonces se concluye que la Biodegradación de B-F en porcentaje es influida significativamente por el tiempo medido en días, es decir que a mayor tiempo, existe menor porcentaje de hidrocarburos en el terrario estudiado.

Coefficientes^a

| Modelo | | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | t | Sig. |
|--------|---------------|--------------------------------|------------|-----------------------------|-------|------|
| | | B | Error típ. | Beta | | |
| 1 | (Constante) | 4.530 | 5.880 | | .770 | .522 |
| | Tiempo (Días) | .696 | .105 | .978 | 6.644 | .022 |

a. Variable dependiente: B - F Porcentaje

Este cuadro muestra los valores de los coeficientes del modelo de regresión lineal, donde la constante es de 4.53 y el coeficiente para la variable tiempo en días es de 0.696; es decir, el modelo está dado por $Y=4.53+0.696X$. Además, este cuadro muestra la asociación de los coeficientes del modelo con la prueba t de student, donde se rechaza la hipótesis nula en que el coeficiente para la constante es nula y por tanto es altamente significativa para el modelo de regresión lineal, ya que el valor de Sig. es menor a 0.05; así también el valor del coeficiente para el tiempo en días.

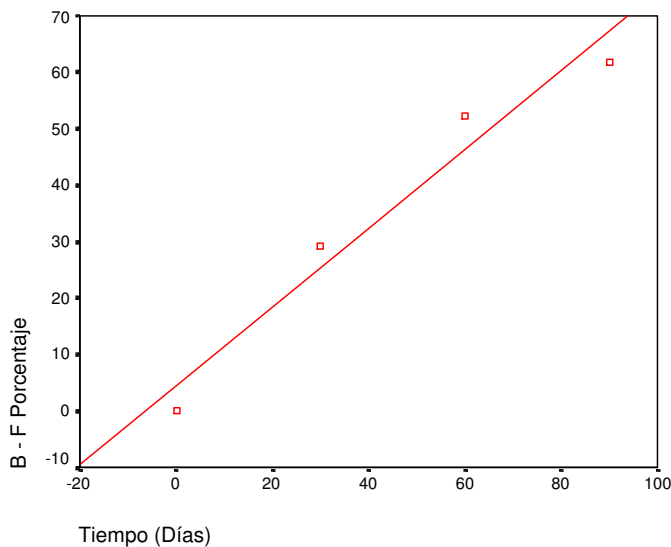


GRAFICO N° 15. Relación de la Biodegradación del terrario B-F (porcentaje) con respecto al tiempo según modelo de regresión lineal

La recta que se muestra en el gráfico, es la gráfica del modelo de regresión dado por $Y=4.53+0.696X$.

Determinación de la relación entre la biodegradación del terrario N+F (Hidroc. g/ 25 g.) con respecto al tiempo.

Para establecer o estudiar la relación entre la reducción de hidrocarburos en gramos con respecto al tiempo, se utilizan el modelo de regresión: $Y = a + bx + c$

X: Variable Independiente (Tiempo en días)

Y: Variable Dependiente (N+F Hidroc. g/25g)

Resumen del modelo

| Modelo | R | R cuadrado | R cuadrado corregida | Error típ. de la estimación |
|--------|-------------------|------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | .968 ^a | .937 | .906 | .2086 |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

Este cuadro da a conocer el resumen del modelo, donde el coeficiente de correlación de 0.968, e indica la existencia de un 96,8 % de relación entre la variables Tiempo (Días) y N + F (Hidroc. g/25g).

ANOVA^b

| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------|-----------|-------------------|----|------------------|--------|-------------------|
| 1 | Regresión | 1.301 | 1 | 1.301 | 29.897 | .032 ^a |
| | Residual | 8.700E-02 | 2 | 4.350E-02 | | |
| | Total | 1.388 | 3 | | | |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

b. Variable dependiente: N + F (Hidroc. g/25g)

Este Cuadro, da a conocer la validez del modelo a través del análisis de Varianza de los coeficientes del modelo; según este cuadro, se rechaza la hipótesis nula a que los coeficientes del modelo de regresión lineal son nulos y por tanto los coeficientes del modelo son altamente significativos en un 95% en el modelo de la regresión lineal de las variables tiempo en días y N+F Porcentaje, ya que el valor de Sig. es menor a 0.05, asociado a la prueba F.

Entonces *se concluye* que la Biodegradación de N+F (Hidroc. g/25g)., es influida significativamente por el tiempo medido en días, es decir que a mayor tiempo, existe menor porcentaje de hidrocarburos en el terrario estudiado.

Coefficientes^a

| Modelo | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | t | Sig. |
|---------------|--------------------------------|------------|-----------------------------|--------|------|
| | B | Error típ. | Beta | | |
| 1 (Constante) | 2.140 | .174 | | 12.264 | .007 |
| Tiempo (Días) | -1.70E-02 | .003 | -.968 | -5.468 | .032 |

a. Variable dependiente: N + F (Hidroc. g/25g)

Este cuadro muestra los valores de los coeficientes del modelo de regresión lineal, donde la constante es de 2.14 y el coeficiente para la variable tiempo en días es de -0.017; es decir, el modelo está dado por $Y=2.14-0.017X$. Además, este cuadro muestra la asociación de los coeficientes del modelo con la prueba t de student, donde se rechaza la hipótesis nula, en que el coeficiente para la constante es nula y por tanto es altamente significativa para el modelo de regresión lineal, ya que el valor de Sig. es menor a 0.05; así también el valor del coeficiente para el tiempo en días.

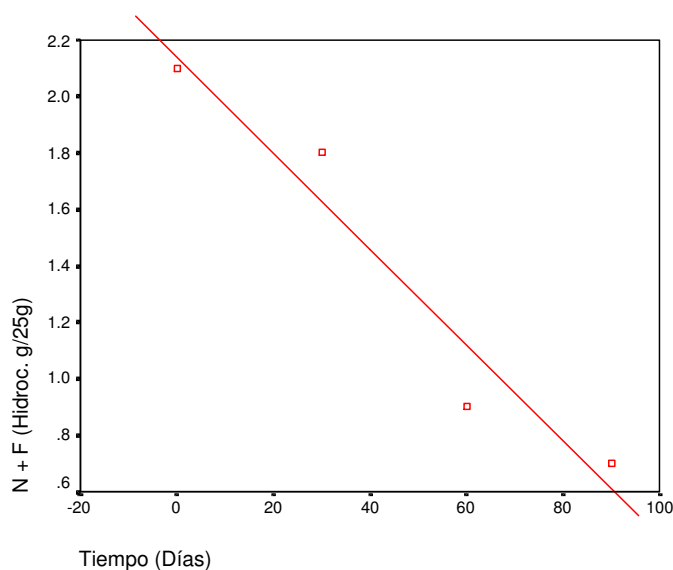


GRÁFICO N° 16. Relación de la Biodegradación del terrario N+F (Hidroc. g/ 25 g) con respecto al tiempo según modelo de regresión lineal

La recta que se muestra en el gráfico, es la gráfica del modelo de regresión dado por $Y=2.14-0.017X$.

Determinación de la relación entre la biodegradación del terrario N+F (Porcentaje) con respecto al tiempo.

Para establecer o estudiar la relación entre la reducción de hidrocarburos en porcentaje con respecto al tiempo se utiliza el modelo de regresión: $Y = a + bx + c$

Y: Variable Independiente (Tiempo en días)

X: Variable Dependiente (N+F Porcentaje)

Resumen del modelo

| Modelo | R | R cuadrado | R cuadrado corregida | Error típ. de la estimación |
|--------|-------------------|------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | .971 ^a | .943 | .914 | 8.7032 |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

Este cuadro da a conocer el resumen del modelo, donde el coeficiente de correlación de 0.971, e indica la existencia de un 97,1 % de relación entre la variables Tiempo (Días) y N+ F (Porcentaje).

ANOVA^b

| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------|-----------|-------------------|----|------------------|--------|-------------------|
| 1 | Regresión | 2486.450 | 1 | 2486.450 | 32.827 | .029 ^a |
| | Residual | 151.490 | 2 | 75.745 | | |
| | Total | 2637.940 | 3 | | | |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

b. Variable dependiente: N + F Porcentaje

Este Cuadro, da a conocer la validez del modelo a través del análisis de Varianza de los coeficientes del modelo; según este cuadro, se rechaza la hipótesis nula que los coeficientes del modelo de regresión lineal son nulos y por tanto los coeficientes del modelo son altamente significativos en un 95% en el modelo de la regresión lineal de las variables tiempo en días y N+F Porcentaje, ya que la el valor de Sig. es menor a 0.05, asociado a la prueba F.

Entonces *se concluye* que la Biodegradación de N+F en porcentaje es influida significativamente por el tiempo medido en días, es decir que a mayor tiempo, existe menor porcentaje de hidrocarburos en el terrario estudiado.

Coefficientes^a

| Modelo | | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | t | Sig. |
|--------|---------------|--------------------------------|------------|-----------------------------|-------|------|
| | | B | Error típ. | Beta | | |
| 1 | (Constante) | 6.050 | 7.282 | | .831 | .493 |
| | Tiempo (Días) | .743 | .130 | .971 | 5.729 | .029 |

a. Variable dependiente: N + F Porcentaje

Este cuadro muestra los valores de los coeficientes del modelo de regresión lineal, donde la constante es de 6.05 y el coeficiente para la variable tiempo en días es de 0.743; es decir, el modelo está dado por $Y=6.05+0.743X$. Además, este cuadro muestra la asociación de los coeficientes del modelo con la prueba t de student, donde se rechaza la hipótesis nula en que el coeficiente para la constante es nula y por tanto es altamente significativa para el modelo de regresión lineal, ya que el valor de Sig. es menor a 0.05; así también el valor del coeficiente para el tiempo en días.

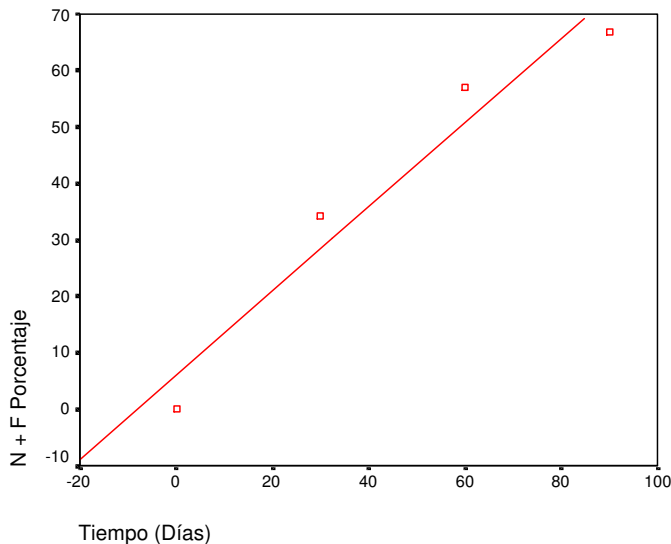


GRÁFICO N° 17. Relación de la Biodegradación del terrario N+F (porcentaje) con respecto al tiempo según modelo de regresión lineal

La recta que se muestra en el gráfico, es la gráfica del modelo de regresión dado por $Y=6.05+0.743X$.

Determinación de la relación entre la biodegradación del terrario N-F (Hidroc. g/ 25 g) con respecto al tiempo.

Para establecer o estudiar la relación entre la reducción de hidrocarburos en gramos con respecto al tiempo es utilizando en el modelo de regresión: $Y = a + bx + c$.

X: Variable Independiente (Tiempo en días)

Y: Variable Dependiente (N-F Hidroc. g/25g)

Resumen del modelo

| Modelo | R | R cuadrado | R cuadrado corregida | Error típ. de la estimación |
|--------|-------------------|------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | .983 ^a | .966 | .949 | .1162 |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

Este cuadro da a conocer el resumen del modelo, donde el coeficiente de correlación de 0.983, e indica la existencia de un 98.3 % de relación entre la variables Tiempo (Días) y N - F (Hidroc. g/25g).

ANOVA^b

| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------|-----------|-------------------|----|------------------|--------|-------------------|
| 1 | Regresión | .761 | 1 | .761 | 56.333 | .017 ^a |
| | Residual | 2.700E-02 | 2 | 1.350E-02 | | |
| | Total | .787 | 3 | | | |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

b. Variable dependiente: N - F (Hidroc. g/25g)

Este Cuadro, da a conocer la validez del modelo a través del análisis de Varianza de los coeficientes del modelo; según éste, se rechaza la hipótesis nula a que los coeficientes del modelo de regresión lineal son nulos y por tanto los coeficientes del modelo son altamente significativos en un 95% en el modelo de la regresión lineal de las variables tiempo en días y N-F Porcentaje, ya que la el valor de Sig. es menor a 0.05, asociado a la prueba F.

Entonces *se concluye* que la Biodegradación de N-F (Hidroc. g/25g), es influida significativamente por el tiempo medido en días, es decir que a mayor tiempo, existe menor porcentaje de hidrocarburos en el terrario estudiado.

Coefficientes^a

| Modelo | | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | t | Sig. |
|--------|---------------|--------------------------------|------------|-----------------------------|--------|------|
| | | B | Error típ. | Beta | | |
| 1 | (Constante) | 2.160 | .097 | | 22.220 | .002 |
| | Tiempo (Días) | -1.30E-02 | .002 | -.983 | -7.506 | .017 |

a. Variable dependiente: N - F (Hidroc. g/25g)

Este cuadro muestra los valores de los coeficientes del modelo de regresión lineal, donde la constante es de 2.16 y el coeficiente para la variable tiempo en días es de -0.013; es decir, el modelo está dado por $Y=2.16-0.013X$. Además, este cuadro muestra la asociación de los coeficientes del modelo con la prueba t de student, donde se rechaza la hipótesis nula en que el coeficiente para la constante es nula y por tanto es altamente significativa para el modelo de regresión lineal, ya que el valor de Sig. es menor a 0.05; así también el valor del coeficiente para el tiempo en días.

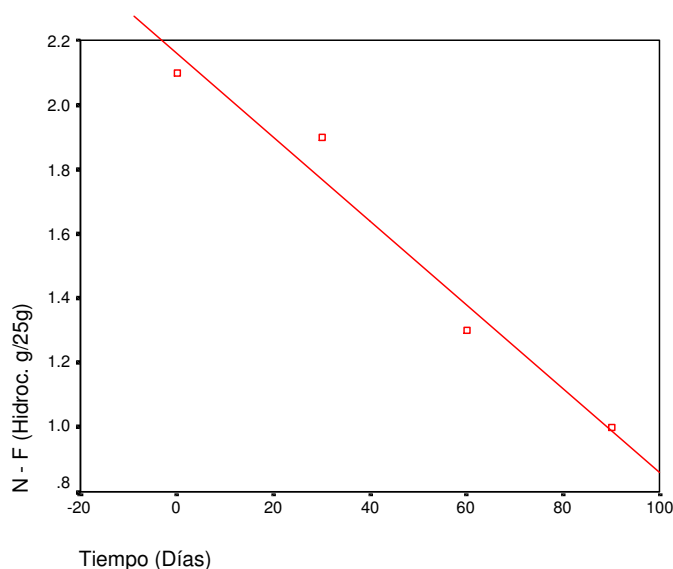


GRÁFICO N° 18. Relación de la Biodegradación del terrario N-F (Hidroc. g/25g) con respecto al tiempo según modelo de regresión lineal

La recta que se muestra en el gráfico, es la gráfica del modelo de regresión dado por $Y=2.16-0.013X$.

Determinación de la relación entre la biodegradación del terrario N-F (Porcentaje) con respecto al tiempo.

Para establecer o estudiar la relación entre la reducción de hidrocarburos en porcentaje con respecto al tiempo se utiliza el modelo de regresión: $Y = a + bx + c$

X: Variable Independiente (Tiempo en días)

Y: Variable Dependiente (N-F Porcentaje)

Resumen del modelo

| Modelo | R | R cuadrado | R cuadrado corregida | Error típ. de la estimación |
|--------|-------------------|------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | .998 ^a | .995 | .993 | 1.9068 |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

Este cuadro da a conocer el resumen del modelo, donde el coeficiente de correlación de 0.998, e indica la existencia de un 99,8 % de relación entre la variables Tiempo (Días) y N - F (Porcentaje).

ANOVA^b

| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------|-----------|-------------------|----|------------------|---------|-------------------|
| 1 | Regresión | 1538.258 | 1 | 1538.258 | 423.063 | .002 ^a |
| | Residual | 7.272 | 2 | 3.636 | | |
| | Total | 1545.530 | 3 | | | |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

b. Variable dependiente: N - F Porcentaje

Este Cuadro, da a conocer la validez del modelo a través del análisis de Varianza de los coeficientes del modelo; según este cuadro, se rechaza la hipótesis nula a que los coeficientes del modelo de regresión lineal son nulos y por tanto los coeficientes del modelo son altamente significativos en un 95%, en el modelo de la regresión lineal de las variables tiempo en días y N-F Porcentaje, ya que la el valor de Sig. es menor a 0.05, asociado a la prueba F.

Entonces *se concluye* que la Biodegradación de N-F en porcentaje es influida significativamente por el tiempo medido en días, es decir que a mayor tiempo, existe menor porcentaje de hidrocarburos en el terrario estudiado.

Coefficientes^a

| Modelo | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | t | Sig. |
|---------------|--------------------------------|------------|-----------------------------|--------|------|
| | B | Error típ. | Beta | | |
| 1 (Constante) | 1.140 | 1.595 | | .715 | .549 |
| Tiempo (Días) | .585 | .028 | .998 | 20.569 | .002 |

a. Variable dependiente: N - F Porcentaje

Este cuadro muestra los valores de los coeficientes del modelo de regresión lineal, donde la constante es de 1.14 y el coeficiente para la variable tiempo en días es de 0.585; es decir, el modelo está dado por $Y=1.14+0.585X$. Además, este cuadro muestra la asociación de los coeficientes del modelo con la prueba t de student, donde se rechaza la hipótesis nula en que el coeficiente para la constante es nula y por tanto, es altamente significativa para el modelo de regresión lineal, ya que el valor de Sig. es menor a 0.05; así también el valor del coeficiente para el tiempo en días.

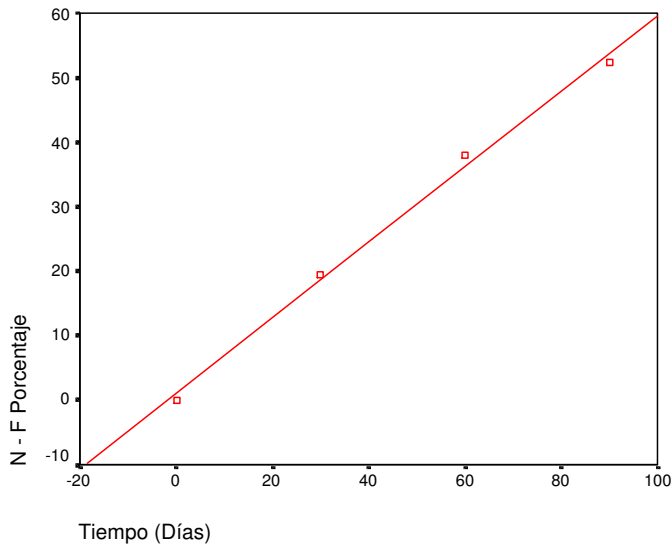


GRÁFICO N° 19. Relación de la Biodegradación del terrario N-F (porcentaje) con respecto al tiempo según modelo de regresión lineal

La recta que se muestra en el gráfico, es la gráfica del modelo de regresión dado por $Y=1.14+0.585X$.

Determinación de la relación entre la biodegradación del terrario CA (Hidroc. g/ 25 g) con respecto al tiempo.

Para establecer o estudiar la relación entre la reducción de hidrocarburos en gramos con respecto al tiempo se utiliza el modelo de regresión: $Y = a + bx + c$

X: Variable Independiente (Tiempo en días)

Y: Variable Dependiente (CA Hidroc. g/25g)

Resumen del modelo

| Modelo | R | R cuadrado | R cuadrado corregida | Error típ. de la estimación |
|--------|-------------------|------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | .978 ^a | .956 | .934 | 9.487E-02 |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

Este cuadro da a conocer el resumen del modelo, donde el coeficiente de correlación de 0.978, e indica la existencia de un 97.8 % de relación entre la variables Tiempo (Días) y CA (Hidroc. g/25g).

ANOVA^b

| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------|-----------|-------------------|----|------------------|--------|-------------------|
| 1 | Regresión | .392 | 1 | .392 | 43.556 | .022 ^a |
| | Residual | 1.800E-02 | 2 | 9.000E-03 | | |
| | Total | .410 | 3 | | | |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

b. Variable dependiente: CA (Hidroc. g/25g)

Este Cuadro, da a conocer la validez del modelo a través del análisis de Varianza de los coeficientes del modelo; según este cuadro, se rechaza la hipótesis nula que los coeficientes del modelo de regresión lineal son nulos y por tanto, los coeficientes del modelo son altamente significativos en un 95% en el modelo de la regresión lineal de las variables tiempo en días y CA Porcentaje, ya que la el valor de Sig. es menor a 0.05, asociado a la prueba F.

Entonces *se concluye* que la Biodegradación de CA (Hidroc. g/25g) es influida significativamente por el tiempo medido en días, es decir que a mayor tiempo, existe menor porcentaje de hidrocarburos en el terrario estudiado.

Coefficientes^a

| Modelo | | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | t | Sig. |
|--------|---------------|--------------------------------|------------|-----------------------------|--------|------|
| | | B | Error típ. | Beta | | |
| 1 | (Constante) | 2.170 | .079 | | 27.339 | .001 |
| | Tiempo (Días) | -9.33E-03 | .001 | -.978 | -6.600 | .022 |

a. Variable dependiente: CA (Hidroc. g/25g)

Este cuadro muestra los valores de los coeficientes del modelo de regresión lineal, donde la constante es de 2.17 y el coeficiente para la variable tiempo en días es de -0.09333; es decir, el modelo está dado por $Y=2.17-0.0933X$. Además, este cuadro muestra la asociación de los coeficientes del modelo con la prueba t de student, donde se rechaza la hipótesis nula en que el coeficiente para la constante es nula y por tanto es altamente significativa para el modelo de regresión lineal, ya que el valor de Sig. es menor a 0.05; así también el valor del coeficiente para el tiempo en días.

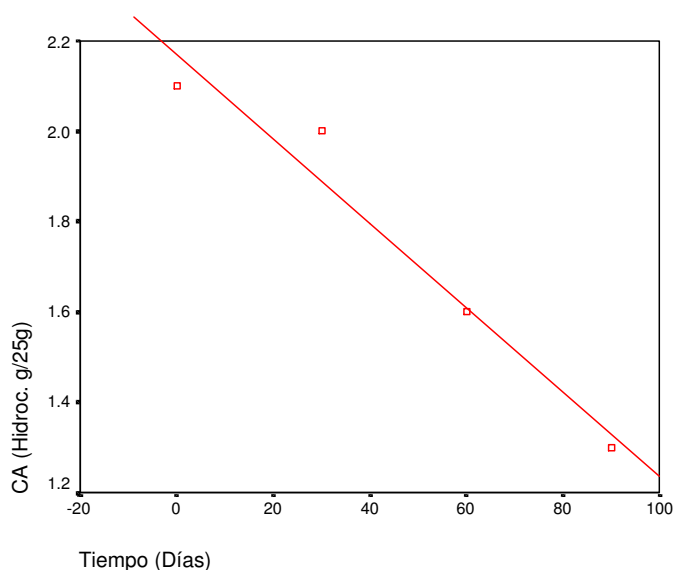


GRÁFICO N° 20. Relación de la Biodegradación del terrario N-F (Hidroc. g/25 g) con respecto al tiempo según modelo de regresión lineal

La recta que se muestra en el gráfico, es la gráfica del modelo de regresión dado por $Y=2.17-0.0933X$.

Determinación de la relación entre la biodegradación del terrario CA (Porcentaje) con respecto al tiempo.

Para establecer o estudiar la relación entre la reducción de hidrocarburos en porcentaje con respecto al tiempo es utilizando en el modelo de regresión: $Y = a + bx + c$

X: Variable Independiente (Tiempo en días)

Y: Variable Dependiente (CA Porcentaje)

Este cuadro, da a conocer la relación que se tomará a partir de la regresión lineal, entre la variables Tiempo y CA Porcentaje.

Resumen del modelo

| Modelo | R | R cuadrado | R cuadrado corregida | Error típ. de la estimación |
|--------|-------------------|------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | .970 ^a | .940 | .910 | 3.7140 |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

Este cuadro da a conocer el resumen del modelo, donde el coeficiente de correlación de 0.970, e indica la existencia de un 97,0 % de relación entre la variables Tiempo (Días) y CA (Porcentaje).

ANOVA^b

| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------|-----------|-------------------|----|------------------|--------|-------------------|
| 1 | Regresión | 433.380 | 1 | 433.380 | 31.419 | .030 ^a |
| | Residual | 27.587 | 2 | 13.794 | | |
| | Total | 460.968 | 3 | | | |

a. Variables predictoras: (Constante), Tiempo (Días)

b. Variable dependiente: CA Porcentaje

Este Cuadro, da a conocer la validez del modelo a través del análisis de Varianza de los coeficientes del modelo; según este cuadro, se rechaza la hipótesis nula a que los coeficientes del modelo de regresión lineal son nulos y por tanto los coeficientes del modelo son altamente significativos en un 95% en el modelo de la regresión lineal de las variables tiempo en días y CA Porcentaje, ya que la el valor de Sig. es menor a 0.05, asociado a la prueba F.

Entonces *se concluye* que la Biodegradación de CA en porcentaje es influida significativamente por el tiempo medido en días, es decir que a mayor tiempo, existe menor porcentaje de hidrocarburos en el terrario estudiado.

Coefficientes^a

| Modelo | | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | t | Sig. |
|--------|---------------|--------------------------------|------------|-----------------------------|-------|------|
| | | B | Error típ. | Beta | | |
| 1 | (Constante) | 2.660 | 3.107 | | .856 | .482 |
| | Tiempo (Días) | .310 | .055 | .970 | 5.605 | .030 |

a. Variable dependiente: CA Porcentaje

Este cuadro muestra los valores de los coeficientes del modelo de regresión lineal, donde la constante es de 2.66 y el coeficiente para la variable tiempo en días es de 0.31; es decir, el modelo está dado por $Y=2.66+0.31X$. Además, muestra la asociación de los coeficientes del modelo con la prueba t de student, donde se rechaza la hipótesis nula en que el coeficiente para la constante es nula y por tanto es altamente significativa para el modelo de regresión lineal, ya que el valor de Sig. es menor a 0.05; así también el valor del coeficiente para el tiempo en días.

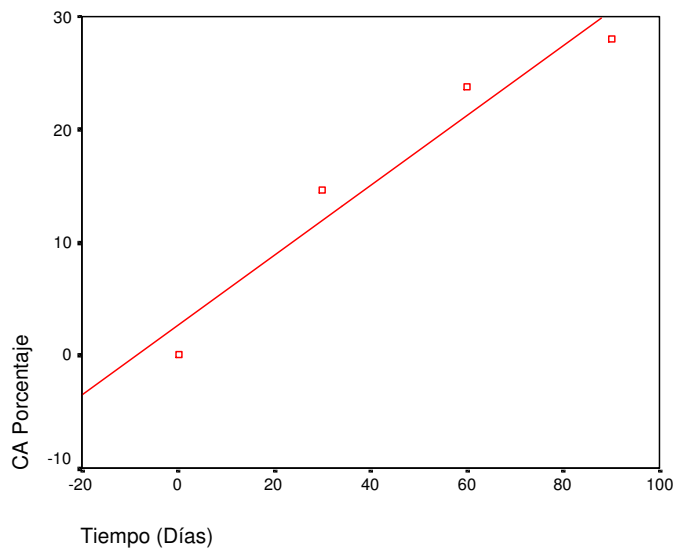


GRÁFICO N° 21. Relación de la Biodegradación del terrario CA (porcentaje) con respecto al tiempo según modelo de regresión lineal

La recta que se muestra en el gráfico, es la gráfica del modelo de regresión dado por $Y=2.66+0.31X$.

5. DISCUSIÓN

Como se observa en el gráfico N° 2, los géneros que se encuentran con mayor frecuencia en los suelos no contaminados con petróleo crudo, procedentes de Cañete son: **Pseudomonas** 31% (18), seguido de **Bacillus** 17.2% (10), **Serratia** con 15.5% (9), **Hafnia y Enterobacter**, cada uno con un 10.3%. (6). Estos datos guardan relación con los obtenidos por Escalante R. el 2002, que aisló en mayor porcentaje los géneros **Pseudomonas, Bacillus y Serratia**, asimismo Bracho M. y col. 2004, en su investigación determinaron que las bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas a partir del suelo estudiado fueron: **Pseudomonas, Bacillus, Staphylococcus y Micrococcus**.

Por otro lado, con respecto a la actividad emulsificante y degradativa de las cepas bacterianas, (cuadro N° 3 y 4), los géneros con mayor actividad emulsificante son: **Pseudomonas, Bacillus, Serratia y Acinetobacter** y la actividad degradativa resultó más alta en los géneros: **Pseudomonas, Bacillus y Hafnia**. Así, Parales R. el año 2000, evaluó la capacidad degradativa y reacción quimiotáctica de cinco cepas, determinando que **Pseudomonas putida**, degrada de manera eficaz los hidrocarburos, por otro lado, Merino F. en 1998, en su estudio determina que las cepas: **Pseudomonas aeruginosa** KT1-1 y **Serratia rubidae**, son los microorganismos con mayor capacidad emulsificante y degradativa, asimismo, Rentería A. y Miranda H. en 1998, realizaron un estudio donde los géneros con mayor actividad degradativa resultaron ser: **Pseudomonas, Micrococcus, Alcaligenes, Acinetobacter y Flavobacterium**, también; Dagher y col., el año de 1997, realizaron un estudio en el que llegaron a la conclusión de que **Pseudomonas aeruginosa** y **Sphingomonas sp.** degradan con mayor eficacia hidrocarburos aromáticos, **Pseudomonas aeruginosa** y **Pseudomonas putida** producen biosurfactantes y **Sphingomonas sp.** bioemulsificantes, igualmente, Hanson K. y col. en 1997, indican que la bacteria del género **Acinetobacter** degrada hidrocarburos con una eficacia del 70% y finalmente, Abalos A. y col. el año 2004, estudian los ramnolípidos de **Pseudomonas aeruginosa** AT10 determinando que la adición de los mismos, acelera la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en un 61% en 10 días de incubación. Por tanto podemos afirmar que los resultados obtenidos por los autores anteriormente mencionados se asemejan a los obtenidos en el presente estudio.

En cuanto al comportamiento de la población bacteriana durante el proceso de biodegradación (cuadro N° 6), podemos resaltar que tanto las bacterias heterótrofas como las oleofilicas en cuanto a su número fueron variables para cada terrario, llegando a incrementarse y llegar a tener valores más altos a los 30 días de iniciado el experimento. Belloso C., el año de 1998, obtiene un valor medio de recuento de microorganismos aerobios totales de 2.6×10^6 UFC/g y 8.8×10^7 NMP/g

de microorganismos oleofílicos a los 30 días de experimentación, estos resultados se parecen a los obtenidos en el presente estudio, ya que al principio del experimento, la disponibilidad de la fuente de carbono es alta y posteriormente disminuye, con lo cual también disminuye la población bacteriana.

La reducción total de hidrocarburos (cuadro N° 7) fue mayor en el terrario B+F, con un porcentaje de degradación del 71.4%, seguido del terrario N+F con un 66.7%, luego el terrario B-F con un 61.9%, N-F con un 52.3% y finalmente el CA con un 28% (gráfico N°4). La degradación mayor se alcanzó a los 30 días de iniciado el experimento (gráfico N°3). De manera similar a ésta, Margesin R. en 1997, en su estudio sobre la eficacia de microorganismos nativos e inoculados para degradación de crudo de petróleo en suelos alpinos, reporta que la biodegradación de hidrocarburos lograda con el uso de la bioestimulación con fertilizantes inorgánicos, fue de 27 al 53%, sin fertilización 16 al 31% y por factores abióticos se logró un porcentaje del 16 al 23%. Asimismo, Beloso C. el año de 1998, en su trabajo sobre la biodegradación de crudo de petróleo en terrarios, obtiene un mayor porcentaje de degradación (45%) en el terrario al que se le había aplicado fertilizantes inorgánicos, mientras que en el control abiótico obtuvo una degradación del 8%. También, Lopolito M. y col. 2005, llevan a cabo experimentos de biodegradación de hidrocarburos utilizando diferentes sustratos como el petróleo, kerosene, aceite lubricante y benceno, y como nutriente un medio mínimo y fertilizante foliar comercial, concluyendo que la inoculación previa acelera el proceso de degradación, además Morgan M. y col. 2005, aplicaron biorremediación en 20 m², durante 369 días, en este suelo se adicionaron nutrientes inorgánicos, aireación y humedad, obteniéndose valores < a 1% de reducción de hidrocarburos recomendada por normas internacionales, de igual forma, Pardo y col. 2004. Midieron la efectividad de la biolabranza (landfarming), durante 4 meses, adicionando fertilizantes inorgánicos, obteniendo al finalizar el experimento, un porcentaje de remoción de hidrocarburos del 91%, igualmente, Volke T. y col. el año 2003, determinaron que los pre-tratamientos electroquímico y mediante adición de surfactantes, adicionales al composteo, produjeron una degradación del 48% y 46% respectivamente, de otro lado, Zucchi M. y col. el 2003, evaluaron la respuesta de una comunidad bacteriana durante la biorremediación en un lapso de 72 días con bioestimulación y aireación adecuada, adición de nutrientes y surfactantes obteniendo una reducción final de hidrocarburos del 39.5%, finalmente, Escalante R. el año 2002, reportó un porcentaje de degradación sin la utilización de bioestimulantes (fertilizantes inorgánicos), del 55% con el consorcio nativo, 92.5%, con el consorcio exógeno (bioaumentado), y del 55% por factores abióticos; en el caso del consorcio nativo obtuvo valores parecidos al del presente estudio en el porcentaje de degradación del terrario B-F (52.3%), mientras que en los valores de degradación correspondientes al consorcio exógeno y control abiótico la mencionada

investigadora obtuvo porcentajes un poco más altos que los del presente trabajo.

Con los resultados indicados anteriormente, podemos afirmar que la reintroducción de microorganismos nativos, parece tener mayor efectividad cuando el microorganismo crece ayudado por la presencia de fertilizantes inorgánicos (bioestimulantes).

En los cuadros N° 8 , 9 y 10, se puede observar las diferentes caracterizaciones del suelo inicial procedente de Cañete y el de los cinco terrarios utilizados en el presente estudio. En lo que respecta al pH (Gráfico N° 5), a los 30 días, éste casi se mantiene similar que al inicio variando en el transcurso del experimento (90 días) entre valores de 6.7 y 8.0. La variación de pH se debe a la transferencia de energía ya que los microorganismos obtienen su energía mediante la oxidación del material reducido (Madigan M., Martinko J. y Parker J. 2000). La humedad también juega un rol importante durante el desarrollo de la biodegradación, es así que durante el estudio, la humedad fluctuó entre 38.65% a 51,09 % (Gráfico N° 6) las condiciones favorables para la biodegradación aerobia en el suelo son adecuadas condiciones de O₂ y H₂O, en general entre 30 a 80% de humedad (Kral D.,Viney M. 1999).

Los diferentes fertilizantes inorgánicos, como el nitrógeno, fósforo y potasio (cuadros N° 8 , 9 y 10) fueron medidos cada 30 días dando valores variados a lo largo del experimento, pero con un tendencia a la disminución a los 90 días (gráficos N° 8, 9 y 10). Es decir que ocurrieron procesos de mineralización e inmovilización de los tres elementos en los terrarios donde fueron aplicados (Kral D.,Viney M. 1999).

Por otro lado, en cuanto a la temperatura durante el proceso de experimentación (cuadro N° 11), ésta fluctuó entre 19,4 °C a 27,3 °C, debiendo encontrarse la temperatura para el proceso de biodegradación, entre 20-30 °C. Tanto la temperatura como la humedad afectan reacciones cinéticas del suelo en biorremediación (Kral D.,Viney M. 1999).

El análisis químico de las fracciones de hidrocarburos del crudo de petróleo (cuadros N° 2 y 12), confirma que los componentes del petróleo que se degradaron con mayor porcentaje fueron: n-pentano, n-hexano y n-decano, debido a que su estructura es más simple que el resto de hidrocarburos . En la transformación de los productos químicos tóxicos están involucrados mecanismos bióticos, estos incluyen: hidrólisis, hidroxilación, dehalogenación, demetilación, metilación, nitroreducción, deaminación, hidrólisis del éter, conversiones de nitrilo a amida y

conjugación. Muchos de estos procesos pueden ocurrir también de manera abiótica.

El petróleo, es la energía primaria más importante a nivel mundial, un alto porcentaje de hidrocarburos se liberan al ambiente por cuestiones de extracción refinado, transporte y almacenamiento. En diferentes países, la contaminación de suelos por hidrocarburos, es frecuente y generalmente se ha tratado de solucionar con el uso de procesos fisicoquímicos, que son altamente eficientes para eliminar altas concentraciones de contaminantes. Sin embargo cuanto se trata de bajas concentraciones de contaminantes, estos procesos son poco factibles debido a sus costos de operación.

El uso de la biorremediación, es una opción que presenta ventajas que son sencillas de implementar, efectivas y ambientalmente seguras, los contaminantes se destruyen o transforman y generalmente no se requieren tratamientos adicionales, a esto se agrega el uso de la bioestimulación para lograr mejores resultados. En este sentido es fundamental el uso de la biorremediación al tratar los derrames de petróleo donde la meta final es la mineralización del contaminante, es decir la completa degradación de una molécula orgánica hasta compuestos inorgánicos y componentes celulares.

6. CONCLUSIONES

1. Se aislaron un total de 58 cepas bacterianas, de éstas, las cepas con mayor capacidad bioemulsificante fueron: ***Pseudomonas aeruginosa* TX-5**, ***Acinetobacter calcoaceticus* T2X-1**, ***Bacillus sp.* TX-4** y ***Serratia rubidae* T2X-8** y por otro lado, las de mayor actividad biodegradativa fueron: ***Pseudomonas aeruginosa* TX-5**, ***Acinetobacter calcoaceticus* T2X-1**, ***Bacillus sp.* TX-4**, ***Hafnia alvei* TX-12** y ***Enterobacter agglomerans* TX-22**.
2. El porcentaje de reducción total de hidrocarburos fue mayor en el terrario B+F (población de bacterias bioaumentadas con adición de fertilizantes inorgánicos), obteniéndose 71,40% de reducción.
3. La adición de fertilizantes inorgánicos como nitrógeno, fósforo y potasio, aumentan la capacidad degradativa de los microorganismos.
4. La población bacteriana tanto heterótrofa como oleofílica, llegó a su mayor cantidad a los 30 días del experimento, para luego disminuir como consecuencia del agotamiento de la fuente de carbono.
5. La reintroducción de microorganismos nativos tiene mayor efectividad en la biodegradación de crudo de petróleo, cuando el microorganismo disponen de fertilizantes inorgánicos.
6. Los componentes del petróleo que sufrieron mayor degradación fueron: n-pentano, n-hexano y n-decano.

7. RECOMENDACIONES

- Los estudios de degradación para valorar el potencial y condiciones medioambientales para el éxito de la biorremediación de un lugar contaminado, deben de ser desarrollados bajo condiciones controladas para poder determinar los porcentajes de remoción del contaminante, bajo determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas en el lugar. Por lo tanto, los estudios deben comprender el monitoreo de parámetros como temperatura, humedad del suelo, aireación y estatus de nutrientes.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aislabie J. 1998. Potencial of biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross Dependency, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*. 49(2): 210-214.
2. Abalos A. y col. 2004. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of rhamnolipid produced by ***Pseudomonas aeruginosa*** AT10. Springer Netherlands. 15 (4): 249-260.
3. Apezteguía A. y Bratovich C. 1999. Bacterias degradadoras de petróleo y derivados. XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Pág. 46. Argentina.
4. Arino S., Marchal R. y Vandecasteele P. y col. 1996. Identification and production of rhamnolipidic biosurfactant by ***Pseudomonas aeruginosa*** species. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45: 162-168.
5. Arroyo M y col. 2004. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminados con hidrocarburos. División de protección de ambientes de suelos. Méjico.
6. Belloso C., Carrario J. y Viduzzi J. 1998. Biodegradación de hidrocarburos en Suelos contenidos en Terrarios. XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Argentina.
7. Belloso C. 1999. Enhancement of hydrocarbons biodegradation rate during landfarming using exogenous microorganisms: A Field study. *Ex situ Biological Treatments Technologies*. Battelle Press (8): 64-76. USA.
8. Belloso C. 1999. Hydrocarbons biodegradation in landfarming soil using exogenous microorganisms obtained from different sources; a field study. Alleman B. C. y A. Lenon (Eds.) *Bioreactor and Ex Situ Biological Treatments Technology*. Battelle Press (5): 75-80. USA .
9. Bracho M. y col. 2004. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos con petróleo en el estado de Zulia. *Revista N°3- División de Medio Ambiente*.Venezuela.
10. Breedveld G. y Karlsen D. 2000. Estimating the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons for bioremediation of creosote

contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(2):255-261.

11. Buckley, E. 1976. Characterization of microbial isolates from an estuarine ecosystem: relationship of hydrocarbon concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*. 32(2):232-237.

12. Churchill S. 1999. Isolation and characterization of a ***Mycobacterium*** species capable of degrading three and four ring Aromatic and Aliphatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(2):549-522 .

13. Cisnero E. 1996. Manual de Química Ambiental. Programa de Educación ambiental . UNALM. Lima- Perú.

14. Coates J. y Andersen R. 2000. Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments. *Trends in Biotechnology*. 18: 408-411.

15. Colbert S y Isakeit T., Ferri M., Weinhold A., Henderson M. 1993. Use of an exotic hydrocarbon source to selectively increase metabolic activity and growth of ***Pseudomonas putida*** in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(7): 2056-2063.

16. Dagher F., Deziel E., Lirette P. y Bisailon J. 1997. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbonated soils. *Canadian Journal of Microbiology*. 43(4): 368-377.

17. Delille D. Basseres A. y Dessommes A. 1998. Effectiveness of bioremediation for oil polluted Antarctic seawater. *Polar Biology*. 19(4): 237-241.

18. Deyta A. y Saval S. 1999. Biodegradación de BTX a nivel microcosmos en suelos contaminados con gasolina. Instituto de Ingeniería. Coordinación de Bioprocesos Ambientales. Universidad Autónoma de México. Pág. 452. México.

19. Escalante R. 2002. Biodegradación de Crudo de Petróleo en Terrarios. Tesis para optar al grado de Magíster. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.

20. Foght J M. y col. 1999. Effect of emisión of biodegradatuion of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. *Applied Environmental Microbiology*. Vol 5 (1): 36-42.

21. Hanson K., Anuranjini N. Y Kapadia M. 1997. Bioremediation of Crude Oil Contamination with ***Acinetobacter sp.*** A3. *Current Microbiology*. 35: 191-193.

22. Haigler B. , Spain J. 1993. Biodegradation of 4-nitrotoluene by ***Pseudomonas sp.*** strain 4NT. Applied and Environmental Microbiology. 59(7): 2239-2243.
23. Juteau P., Rho D. y Larocque A. 1999. Analysis of the relative abundance of different types of bacteria capable of toluene degradation in a compost biofilter. Applied Microbiology and Biotechnology. 52(6): 863-868.
24. Kral D., Viney M. 1999. Bioremediation of contaminated soils. American Society of Agronomy. Madison Wisconsin USA.
25. Korda A., Santas P., Tenente A. Y Santas R. 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. Applied Microbiology and Biotechnology. 48(65): 677-686.
26. La Grega M. y Buchman P. 1996. Gestión de Residuos Tóxicos. Editorial Mc Graw Hill- Interamericana. Madrid- España.
27. Lopolito M. y col. 2005. Biodegradación de hidrocarburos del petróleo y compuestos relacionados. Instituto nacional de ciencias y técnicas hídricas. Argentina.
28. Machin J. 1999. Efecto de la Bioestimulación en la Biodegradación de Hidrocarburos de un suelo contaminado, en reactores de Fase Semisólida. VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Pág. 365. México.
29. Mac Gillvray, A.R. y Shiaris. M.P. 1994. Relative role of eukaryotic and prokaryotic microorganisms in phenanthrene transformation in coastal sediments. Applied and Environmental Microbiology. 60 (4): 1154-1159.
30. Madigan M., Martinko J. y Parker J. 2000. Brock Biología de los Microorganismos. 8ª edición. Editorial Prentice Hall. Madrid-España.
31. Margesin R. y Schinner F. 1997. Efficiency of Indigenous and Inoculated Cold Adapted soil microorganisms for biodegradation of Diesel Oil in Alpine soils. Applied and Environmental Microbiology. 63(7): 2660-2664.
32. Margesin R. y Schinner F. 1997. Bioremediation of diesel-oil contamination alpine soils at low temperature. Applied Microbiology and Biotechnology. 47(4): 462-468.

33. Margesin R. y Schinner F. 2001. Bioremediation (Natural attenuation and biostimulation of Diesel-oil contaminated soil in Alpine Glacier Skiing area. U.S.A. Applied and Environmental Microbiology. 67(7).
34. Mariacute T y col. 2005. Effect of petrochemical aludge concentrations on microbial communities during soil bioremediation. FEMS Microbiology Ecology. 52:2, 305-316.
35. Merino F. 1998. Estudio de microorganismos nativos productores de Emulsificantes de Petróleo. Tesis para optar al título de Magister . UNMSM. Lima- Perú.
36. Martinez M. y col .2002. El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a contaminación por vertidos de petróleo. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad autónoma de Barcelona. España.
37. Mishra S. y Jiot J. 2001. In situ bioremediation potential of an oily sludge degrading bacteria consortium. Current Microbiology. 43 : 328-335.
38. Morales D., Machin C. y Trejo M. 1999. Biodegradación de Petróleo Crudo tipo Maya en Medio Acuoso. VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Pág. 410. México.
39. Morgan N. y col. 2005. Biorremediación de suelos impactados por hidrocarburos de petróleo. Revista cubana de Medio ambiente. Cuba.
40. Morris A. Levin. 1997. Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Editorial Mc Graw Hill. Interamericana. Madrid-España.
41. Morry. M.F. 1998. Manual de Prevención de la Contaminación Industrial. Editorial Mac Graw Hill. Interamericana. Madrid- España.
42. Nwachukwu S. 2001. Bioremediation of Sterile Agricultural Soils Polluted with Crude Petroleum by application of de soil bacterium, ***Pseudomonas putida***, with Inorganic Nutrient Supplementation. Current Microbiology. 42: 231-236.
43. Ortiz A., Quintero R. y Trejo R. 1999. Biodegradación de Petróleo Crudo Maya en Fase Sólida. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Pág. 412. México.

44. Panicker G. , Aislabie J. y Sau D. 2001. Cold tolerance of *Pseudomonas* sp. 3O-3, isolated from oil contaminated soil, Antarctica. *Polar Biology*.
45. Parales R. y Ditty J. 2000. Toluene degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene and trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9): 4098-4104.
46. Pardo J. y col. 2004. Afecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo- a nivel laboratorio. *Revista de medio ambiente y microbiología de suelos*. Méjico.
47. Pozzo A. 1996. Biodegradación de residuos de petróleo por bioaumentación con bacterias nativas en suelos regionales. *Gerencia ambiental*. Pág. 391-393.
48. Radwans S., Sorkhoh N. y Fardoun F. 1995. Soil management enhancing hydrocarbons biodegradation in the polluted Kuwait desert. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 44(1): 265-270.
49. Rentería A. y Miranda H. 1998. Aislamiento y Selección primaria de Microorganismos Capaces de Utilizar petróleo como única fuente de carbono. I Congreso Peruano de Biotecnología y Bioingeniería. Trujillo- Perú.
50. Smith V. y Graham D. 1998. Application of Resource-Ratio theory to Hydrocarbon biodegradation. *Environmental Science Technology*. Pág. 3386- 3395.
51. Valladares M. y Trejo M. 1999. Biodegradación de la fracción recalcitrante del Petróleo Crudo Maya. VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Pág. 413. México.
52. Vecchioli G. y Constanza O. 1999. Importancia de seleccionar el método de análisis de hidrocarburos totales en la evaluación de procesos de biorremediación. XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Pág. 43. Argentina.
53. Viñas M. y col 2005. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote contaminated soil. *Applied Environmental microbiology*. P. 7008-7018.

54. Volke T., Velasco J. 2003. Biodegradación de hidrocarburo de petróleo en suelos intemperizados mediante composteo. Centro nacional de Investigación y capacitación Ambiental. Méjico.
55. Zhongqi H. y col. 1997. Studies of the catabolic pathway of degradation of nitrobenzene by ***Pseudomonas pseudoalcaligenes*** JS45: removal of the amino group from 2-aminomuconic semialdehyde. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (12): 4839-4843.
56. Zucchi M. y col. 2003. Response of bacterial community during bioremediation of an oil polluted soil. *Journal of Applied Microbiology*. 94 (2): 248-257.

9. ANEXOS

9.1. MATERIALES DE VIDRIO Y OTROS

- Viales de vidrio
- Tubos de 10x75mm
- Tubos de 13x100
- Tubos de 16x150
- Placas Petri
- Matraces de 100 ml
- Matraces de 500 ml
- Probetas de 500 ml
- Tubos de centrifuga de 10 ml
- Pipetas de 10 ml
- Pipetas de 1 ml
- Dispenser de 5 ml
- Propipetas
- Beaker de 500 ml

Otros

- Agua destilada
- Papel Kraft
- Algodón
- Papel Aluminio
- Espátulas
- Papel filtro
- Hipoclorito de sodio
- Resina epoxi
- Suelos contaminados con petróleo crudo
- Recipientes de 40 l
- Bolsas

9.2. REACTIVOS

Reactivos

- Eter dietílico
- Parafina
- Aceite de inmersión
- Bateria de coloración Gram
- Etanol
- Cloruro de Sodio
- Sulfato de Magnesio
- Sulfato de Magnesio heptahidratado
- Sulfato de amonio
- Fosfato dipotásico
- Fosfato monopotásico

- Fosfato disódico
- Fosfato monosódico
- Citrato de amonio férrico
- Cloruro de Amonio
- Cloruro de Calcio
- Reactivo Zn
- Reactivo para prueba de Indol
- Reactivo para prueba oxidasa
- Sulfato de sodio anhidro
- Biclорuro de Mercurio

9.3 EQUIPOS Y APARATOS

- Centrifuga.
- Horno esterilizador
- Espectrofotometro
- Agitador
- Incubadora
- Autoclave
- Soxhlet
- Baño María
- Mechero Bunsen

9.4. COMPOSICIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS

AGAR NUTRICIO

Peptona de carne.....3 g
Extracto de carne.....0.9 g
NaCl.....1,5 g
Agar.....4,5 g
Agua destilada.....300 ml
pH.....7,0
Esterilización: 21°C por 15 minutos.

MEDIO MINERAL (MILLIS Y COL. 1978)

ClNa.....24,00 g
ClK.....0,70 g
KH₂ PO₄.....2,00 g
Mg SO₄. 7 H₂O.....1,00 g
Na₂ HPO₄.....3,00 g
NH₄NO₃.....1,00 g
Agua destilada.....1000 ml
Petróleo crudo.....10 ml
pH final 7

Esterilización a 121 °C por 15 minutos.

MEDIO MINIMO DE GOLDMAN Y COL. 1982

K₂HPO₄.....18 g
KH₂PO₄.....6 g
Mg SO₄.....0.2 g
(NH₄)₂ SO₄.....4,0 g
Etanol.....20 ml
Agua destilada.....1000 ml

pH final 7

Esterilización a 121 °C por 15 minutos.

CLORURO DE SODIO AL 0,85%

NaCl.....8,5 g
Agua destilada.....1000 ml

pH 7

Esterilización a 121 °C por 15 minutos.

REACTIVO OXIDASA

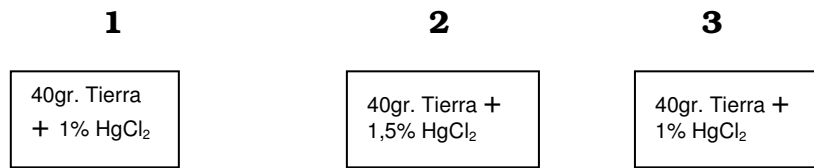
Tetrametil-p-fenilendiamina.....1g
Alcohol isoamílico.....100 ml

REACTIVO PARA LA INVESTIGACION DE INDOL (JAMES)

Compuesto J2183.....0,5 gr
HCl 1N.....100 ml

9.5. PRUEBA DE TOXICIDAD DEL BICLORURO DE MERCURIO

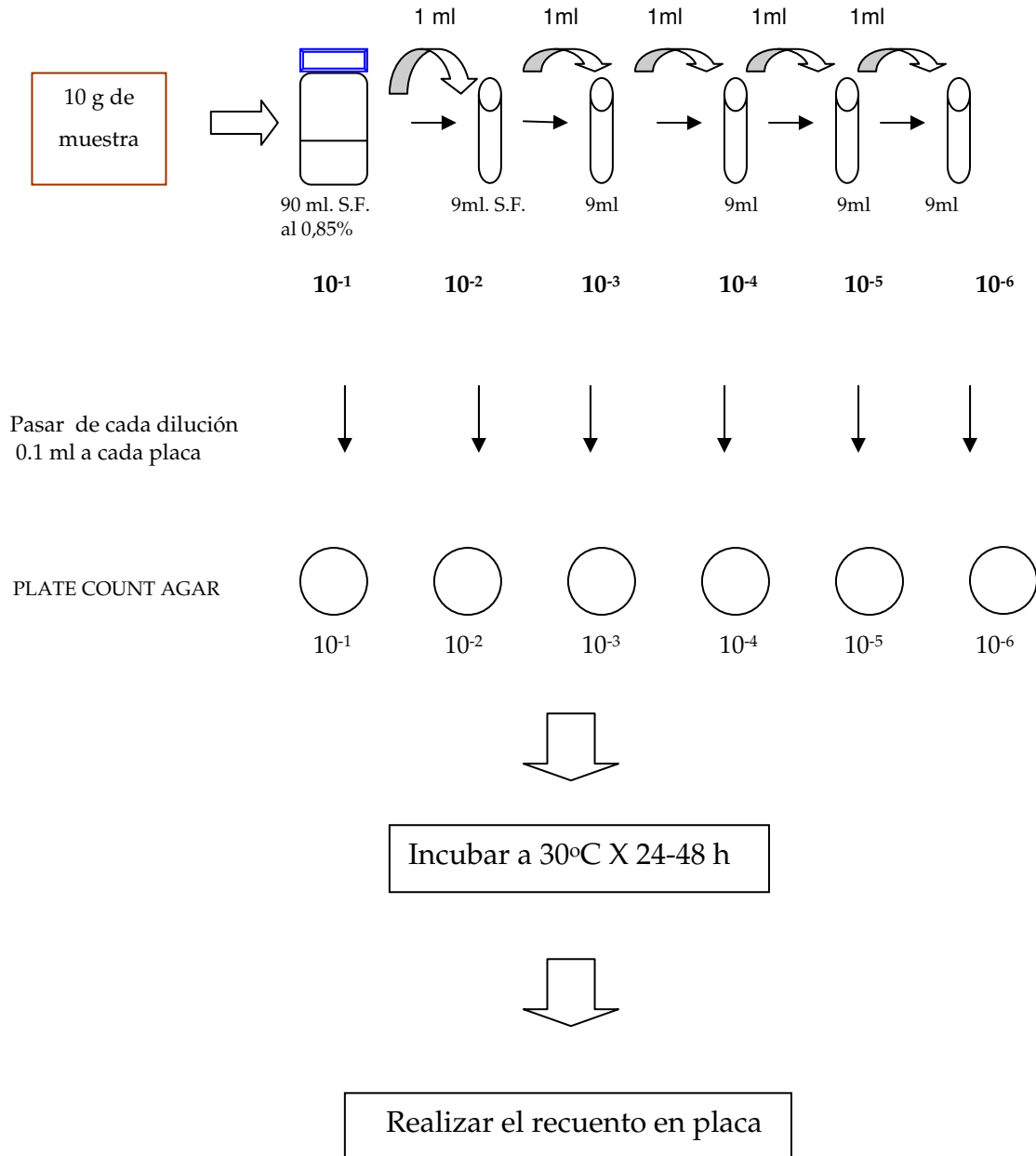
Para esta prueba se procedió a preparar tres concentraciones diferentes de HgCl₂, basadas en la proporción propuesta por Claudio Belloso al 2% (2g HgCl₂ /100g de mezcla seca) ; las concentraciones del HgCl₂, fueron aplicadas como siguen: la primera al 1% (0.4g HgCl₂/ 40g. de suelo), la segunda al 1,5% (0.6g HgCl₂/ 40g de suelo) y la tercera al 2% (0.8g. HgCl₂/ 40g. de suelo), estas fueron mezcladas con 40 g de suelo (que será utilizado durante el trabajo de investigación), de tal manera que nos permitió evaluar la toxicidad del bicloruro de mercurio durante un mes realizando recuentos bacterianos (técnica de recuento en placa) cada semana y así poder seleccionar una concentración adecuada para nuestro terrario CA (CA: Control abiótico), donde evaluaremos pérdidas abióticas de hidrocarburos.



☞ Al inicio del experimento y durante 4 semanas, se realizó el recuento de población bacteriana (10 g de tierra), según esquema N° 1.

ESQUEMA N° 1

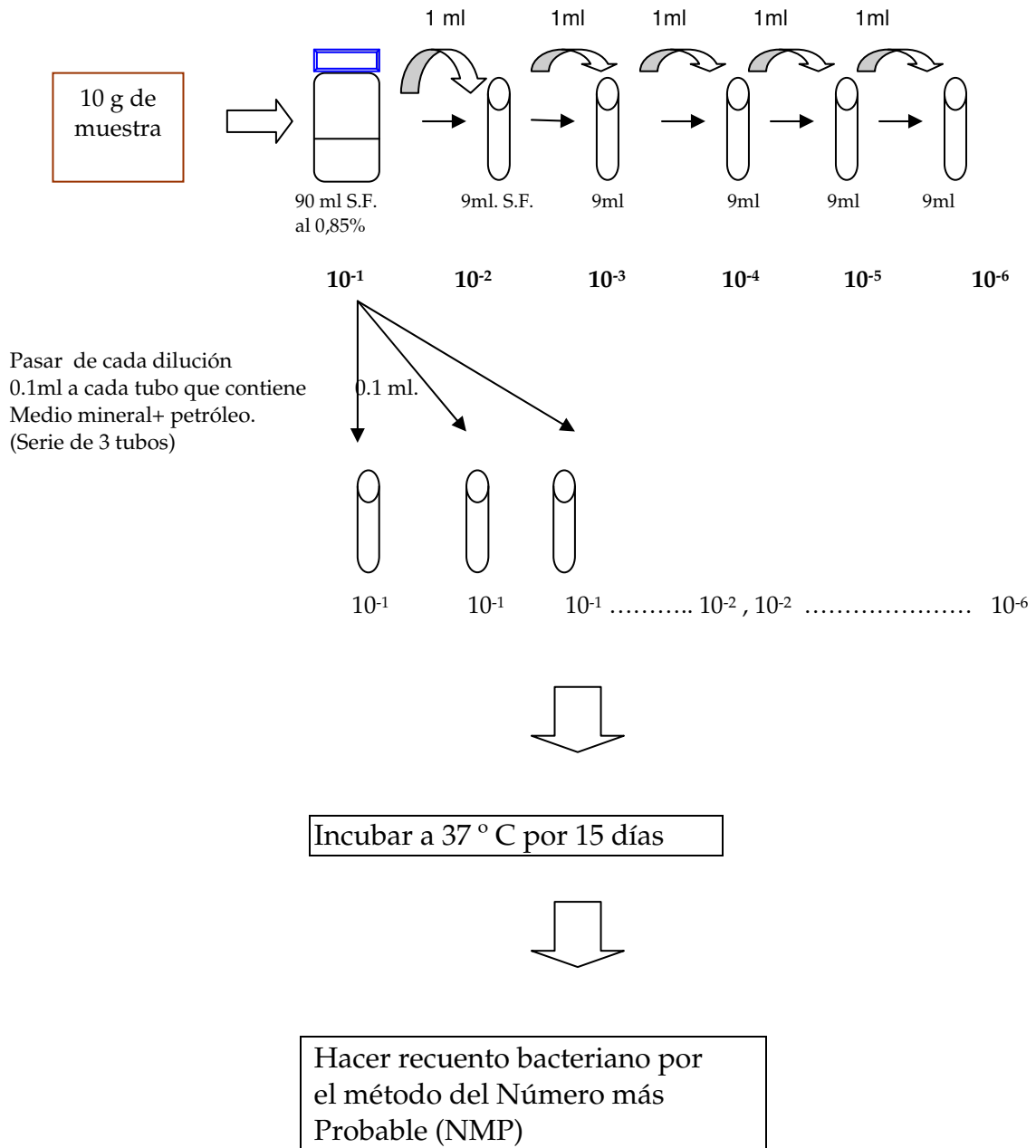
RECuento DE BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILAS



S.F.: Solución fisiológica

ESQUEMA N° 2

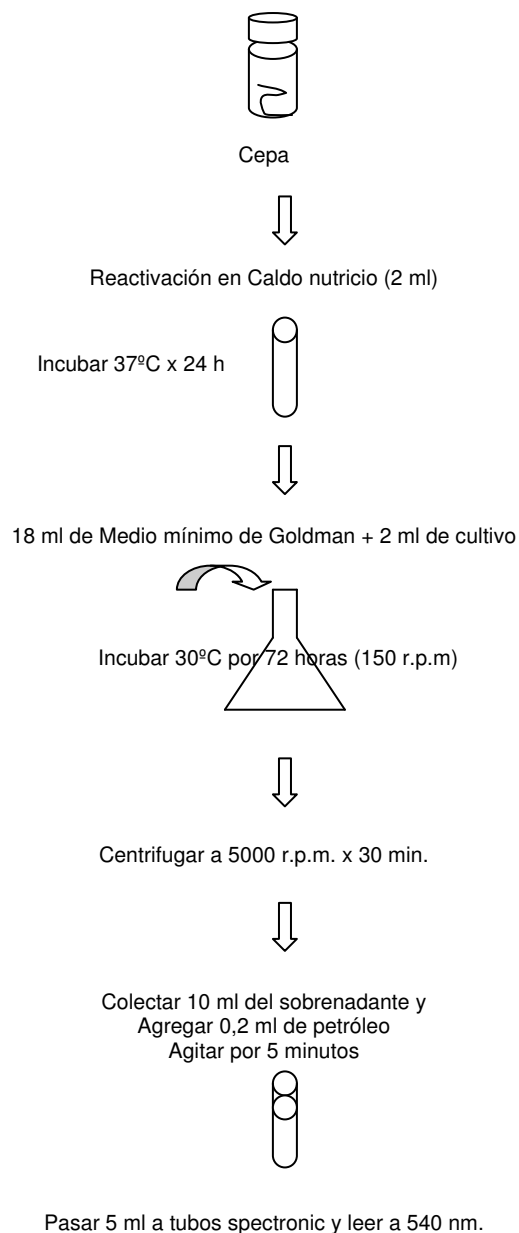
RECuento DE BACTERIAS oleofílicas



S.F.: Solución fisiológica

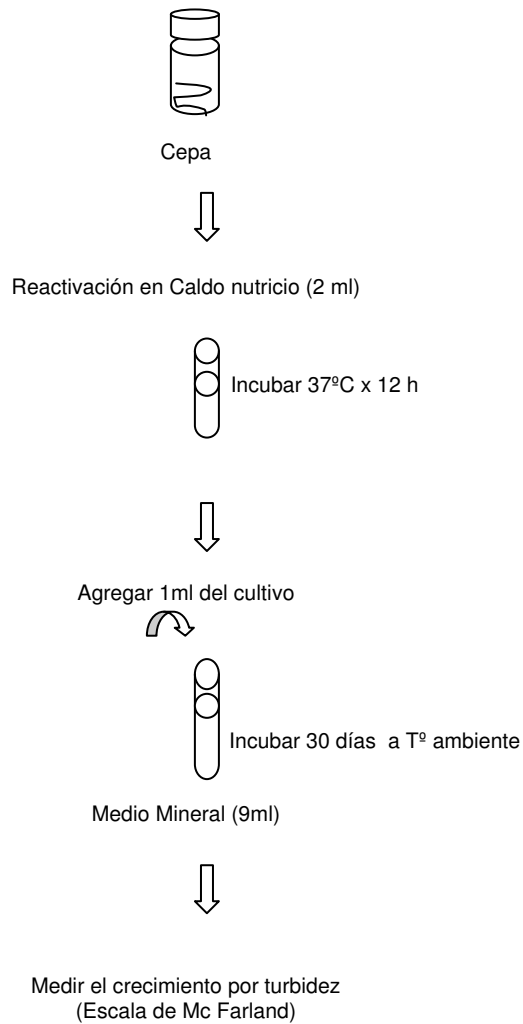
ESQUEMA Nº 3

ACTIVIDAD BIOEMULSIFICANTE DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO (Goldman y col. 1982- Modificaco por Merino y col. 1991)



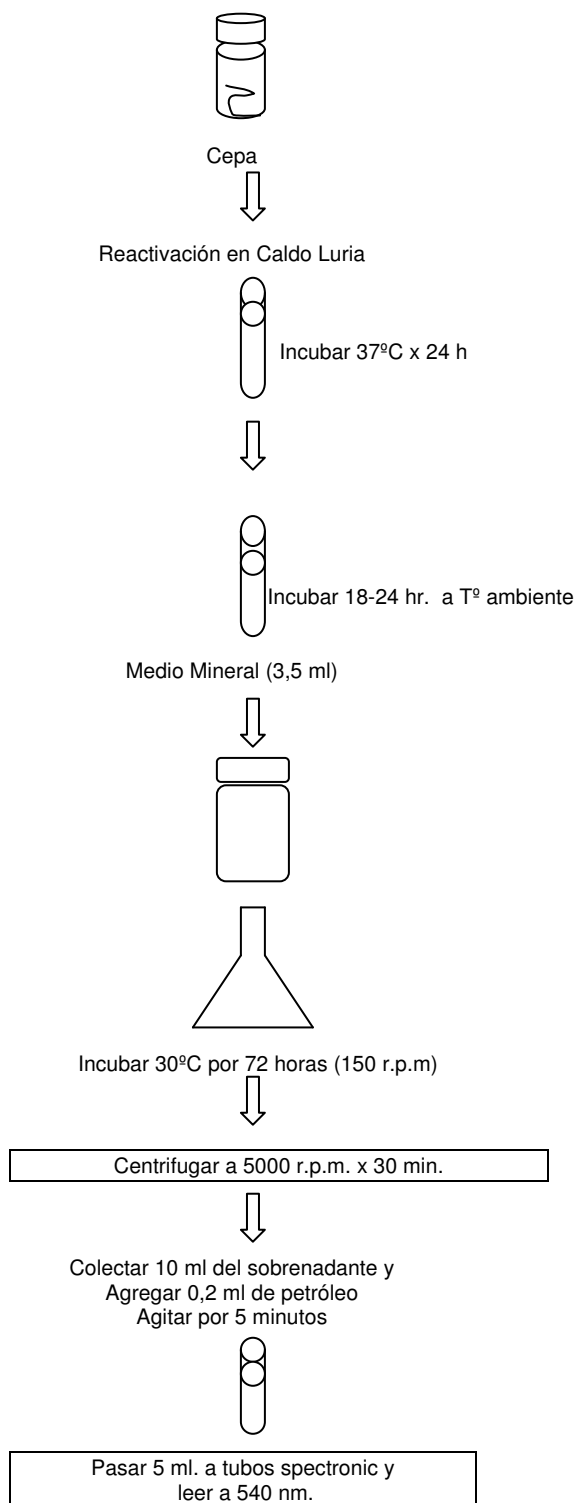
ESQUEMA N° 4

ACTIVIDAD BIODEGRADATIVA DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO (Mills y col.)



ESQUEMA N° 5

CINÉTICA PARA BACTERIAS DEGRADADORAS DE PETROLEO (Merino y col. 1991)



FLUJOGRAMA N° 2

CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE HIDROCARBUROS TOTALES EN MUESTRAS DE SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO CRUDO.

