



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**COLONIAS BACTERIANAS PRESENTES EN EL ESTIÉRCOL DE GALLINAS
BLANCAS DE LA CEPA LEGHORN RESPONSABLES DE LA BIODEGRADACIÓN
DE PETRÓLEO EN SUELOS CONTAMINADOS**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

Presentado Por:

Br. Muñoz Vitor, Jim Maycol

Br. Pacheco Miranda, Mabel

Asesor:

Dra. CHAVEZ FLORES, JUANA ELVIRA

LIMA – PERÚ

2017

DEDICATORIA

Con amor y gratitud a nuestros padres queridos por la confianza, paciencia y sacrificio que han hecho posible la culminación de nuestra profesión

A nuestros hermanos por su invaluable cariño y confianza que han depositado en nuestra persona

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a dios padre por su inmensa misericordia que día a día nos acompaña espiritualmente; iluminando nuestras vidas y a culminar con éxito nuestra carrera Q.F.

Agradecemos a nuestros padres por su valioso apoyo quienes han sido los que día a día nos inculcaron a ser profesionales.

Nuestro agradecimiento infinitamente a nuestra asesora de tesis Dra. Q.F Juana Elvira Chávez Flores por su apoyo y paciencia que incansablemente nos fue guiando pasó a paso para culminar este trabajo de tesis.

Agradecemos sinceramente al jurado evaluador y calificador nombrado por la Facultad De Farmacia Y Bioquímica de la Universidad Norbert Wiener conformado por los docentes:

- Dr. Q.F. Juan Manuel Marín Bravo
- Dr. Q.F. Enrique León Soria
- Dr. Q.F. Miguel Félix Veliz

Quienes con su apoyo profesional y experiencia, han hecho posible la culminación del presente trabajo.

Gracias

INDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento de problema	2
1.1.1 Formulación de problema	3
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo general	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
1.3 Hipótesis	4
1.3.1 Hipótesis general	4
1.4 Variables	4
1.4.1 Variable independiente	4
1.4.2 Variable dependiente	4
1.5 Indicadores	4
II. GENERALIDADES	5
2.1 Antecedentes de la investigación	5
2.1.1 Antecedentes internacionales	5
2.2.1 Antecedentes nacionales	7
2.2 Petróleo	9
2.2.1 Composición del crudo de petróleo	9
2.2.2 Refinado del crudo de petróleo	10
2.2.3 Tratamiento del petróleo y sus derivados	13
2.2.4 Impacto de los hidrocarburos en el suelo	14
2.2.5 Impacto de los hidrocarburos en las plantas	15
2.2.6 Impacto de los hidrocarburos en las semillas	16
2.3 Biorremediación	16
2.3.1 Factores que influyen en la biodegradación	18
2.3.1.1 Temperatura	18
2.3.1.2 Concentración de hidrocarburos	18
2.3.1.3 Oxígeno	19
2.3.1.4 Nutrientes	19

2.3.1.5	Estructura del suelo	20
2.3.1.6	Valor de pH	20
2.3.2	Valores óptimos para el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburo	20
2.4	Microorganismos	21
2.4.1	Bacterias	21
2.4.2	Hongos	22
2.5	Suelos	23
2.5.1	Características del suelo	23
2.5.2	Clasificación de suelos	24
2.5.3	Beneficios del estiércol y el aserrín	24
2.6	Especies nativas reductoras de la concentración de hidrocarburos en suelos contaminados	26
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1	Tipo de investigación	28
3.1.1	Análisis descriptivo	28
3.1.2	Diseño de bloques completamente al azar.	28
3.1.3	Regresión lineal simple	29
3.2	Área de estudio	30
3.3	Equipos, materiales, medios de cultivos y reactivos	30
3.3.1	Equipos	30
3.3.2	Materiales	30
3.3.3	Medios de cultivo	31
3.3.4	Reactivos	32
3.4	Métodos	32
3.4.1	Recolección de muestras	32
3.4.2	Conservación, transporte de la muestra	33
3.4.3	Análisis de la tierra	33
3.4.3.1	Acondicionamiento del material	33
3.4.3.2	Cantidad de muestras a utilizar	34
3.4.3.3	Ensayos de esterilidad	34
3.4.4	Caracterización de suelo (análisis fisicoquímico)	35
3.4.5	Contaminación del suelo estéril con petróleo.	36

3.4.6	Análisis fisicoquímico y determinación de hidrocarburos	36
3.4.7	Recuento de bacterias presentes en el suelo contaminado y suelo no contaminado con respecto a su tratamiento.	37
3.4.8	Determinación de microorganismos específicos en la muestra de suelo contaminado y no contaminado	38
3.4.8	Determinación del proceso de biodegradación del petróleo utilizando como indicador a la planta <i>triticum aestivum</i> ” trigo”	40
3.4.8.1	Distribución del diseño experimental (DBCA)	40
3.4.8.2	Dosificación de tratamientos	40
3.4.8.3	Instalación del experimento	41
3.4.8.4	Medición de las variables en el experimento	43
IV.	RESULTADOS	46
V.	DISCUSIONES	67
VI.	CONCLUSIONES	69
VII.	RECOMENDACIONES	70
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Fracciones que se pueden obtener durante el proceso de destilación Fraccionada de un crudo de petróleo	12
Tabla 2. Valores óptimos para el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo	20
Tabla 3. Condiciones deseables en el proceso de degradación de estiércol y aserrín	25
Tabla 4. Plantas reductoras de hidrocarburos	27
Tabla 5. Cuadro ANOVA para un diseño en bloques completamente al Azar	29
Tabla 6. Dosificación de tratamientos de suelos contaminados y suelos sin contaminar.	39
Tabla 7. Combinaciones de tratamientos en el suelo contaminado y suelo sin contaminar	39
Tabla 8. Resultados de la prueba de esterilidad	44
Tabla 9. Análisis de la caracterización fisicoquímica del suelo	44
Tabla 10. Resultados de la concentración inicial de hidrocarburos en el suelo contaminado	45
Tabla 11. Estadística descriptiva en suelo contaminado y suelo no contaminado por tratamiento acorde al peso	50
Tabla 12. Estadística descriptiva en suelo no contaminado por tratamiento Acorde a la temperatura	51
Tabla 13. Intervalo de las variables dependientes e independientes	53
Tabla 14. Altitud promedio obtenida en cada tratamiento por macetero (cm) durante los 180 días que duro el experimento	54
Tabla 15. Análisis de variancia por macetero (cm) durante los 180 días que duro el experimento	56
Tabla 16. Análisis de efectos simples de suelo.	57

INDICE DE GRAFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Distribución de los principales derivados del petróleo	14
Gráfico 2. El proceso de descomposición de la materia orgánica	22
Gráfico 3. Variación porcentual de la degradación de los hidrocarburos después del tratamiento	47
Gráfico 4. Recuento microbiano en el suelo no contaminado	48
Gráfico 5. Recuento microbiano en el suelo contaminado	49
Gráfico 6. Prueba de Homocedasticidad y normalidad	55
Gráfico 7. Interacción de la variable altura	58
Gráfico 8. Tukey – Comparativo de tratamientos en un DBCA	59
Gráfico 9. Gráfico de contorno de la relación de la humedad vs la altura y el log (bacterias)	60
Gráfico 10. Gráfico de contorno de la relación de la degradación de los hidrocarburos de petróleo vs la altura y el log (bacterias).	61
Gráfico 11. Control de Calidad de la temperatura en el suelo contaminado con respecto al tratamiento B3	62
Gráfico 12. Cinética del peso del crecimiento de la planta <i>Triticum aestivum</i> “Trigo” en el suelo contaminado con relación al tratamiento	63
Gráfico 13. Cinética del peso del crecimiento de la planta <i>Triticum aestivum</i> “Trigo” en el suelo no contaminado con relación al tratamiento	64
Gráfico 14. Efecto microbiológico sobre el peso de la planta <i>Triticum aestivum</i> “Trigo” con respecto al tipo de suelo contaminado y sin contaminar	65
Gráfico 15. Gráfico de contorno de la degradación de hidrocarburos vs el Logaritmo de las bacterias	66

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Recolección de muestra de suelo sin contaminar.	33
Figura 2. Prueba de esterilidad a la muestra de suelo recolectado y esterilizado	35
Figura 3. Recuento microbiano de bacterias aeróbicas mesofilas en suelo contaminado y suelo no contaminado.	37
Figura 4. Prueba de viabilidad de la semilla de <i>Triticum aestivum</i> “Trigo”.	40
Figura 5. Instalación de experimento con los tratamientos mencionados en la tabla 6.	41
Figura 6. Crecimiento de la planta de <i>Triticum aestivum</i> “Trigo” en (A) se muestra el crecimiento a los 30 días y en (B) a los 60 días, bajo condiciones naturales.	42
Figura 7. Crecimiento de la planta <i>Triticum aestivum</i> “Trigo” en (A) se muestra el crecimiento a los 120 días y en (B) a los 180 días, bajo condiciones naturales.	43

RESUMEN

El presente trabajo tiene como finalidad evaluar el proceso de biodegradación de hidrocarburos en un suelo contaminado, empleando colonias microbiológicas presentes en el estiércol de las gallinas blancas de la cepa leghorn, se realizaron tres tipos de análisis, el primero el análisis de varianza para un diseño en bloques completamente al azar (DBCA), de modelo factorial 2A 3B con seis repeticiones (6 maceteros) dando un total de 36 maceteros experimentales (1 kg c/u), el segundo un análisis de varianza (ANOVA) con post Hoc Tukey, y por último análisis de regresión lineal simple para determinar la degradación de hidrocarburos por factores ambientales. El análisis fue procesado cada seis días, donde se determinó: Hidrocarburos totales, humedad, pH, recuento microbiológico, temperatura y tiempo. Los maceteros fueron expuestos a la intemperie durante 180 días. Los resultados mostraron que el tratamiento B3 (colonias bacterianas presentes en el estiércol de gallinas blancas de la cepa leghorn mas aserrín de roble más semilla de *Triticum aestivum*) en el suelo contaminado por hidrocarburos C6-C10 en promedio disminuyo 97,4%, el contenido de hidrocarburos C10-C35 en el suelo disminuyo solo 92,95% y el contenido de hidrocarburos C10-C28 en el suelo disminuyo 30%. Demostrando que el tratamiento B3 es responsable de la degradación del hidrocarburo de petróleo presentando un alto porcentaje de remoción (91,1%) de hidrocarburos totales en comparación a los tratamientos B1 y B2.

Palabras clave. Biorremediación, hidrocarburos, estiércol orgánico, aserrín

SUMMARY

The present work aims to evaluate the process of biodegradation of hydrocarbons in a contaminated soil using microbiological colonies present in the manure of the white hens of the leghorn strain, three types of analysis were performed, the first analysis of variance for a design (DBCA), factorial model 2A 3B with six replicates (6 planters) yielding a total of 36 experimental planters (1 kg each), the second an analysis of variance (ANOVA) with post Hoc Tukey, And finally simple linear regression analysis to determine the hydrocarbon degradation by environmental factors. The analysis was processed every six days, where it was determined: total hydrocarbons, humidity, pH, Microbiological Counts, temperature and time. The pots were exposed to the elements for 180 days. The results showed that the treatment B3 (bacterial colonies present in the manure of white hens of the leghorn strain mas oak sawdust mas *Triticum* Seed) in the soil contaminated by C6-C10 hydrocarbons on average decreased 97.4%, the hydrocarbon content C10-C35 in the soil decreased only 92.95% and the C10-C28 hydrocarbon content in the soil decreased by 30%. Demonstrating that treatment B3 is responsible for the degradation of petroleum hydrocarbon presenting a high percentage of removal (91, 1%) of total hydrocarbons compared to treatments B1 and B2.

Keywords. Bioremediation, hydrocarbons, organic manure, sawdust

I. INTRODUCCIÓN

El crecimiento poblacional y el desarrollo industrial durante los últimos tiempos, ha incrementado de forma relevante, la presencia de contaminantes sólidos y líquidos convencionales, así como el vertimiento de gases contaminantes a la atmosfera. La consecuencia ha sido la aparición de graves problemas de contaminación sin antecedentes notables y para los cuales la naturaleza no estaba preparada, este grave problema de contexto ambiental lo representan los residuos peligrosos que, aproximadamente el 54% corresponde a derivados del petróleo. Así que, debido a esto, el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos es esencial para mantener la calidad del medio ambiente.¹

Los problemas de contaminación ambiental en el ámbito local, nacional e internacional son parte de nuestra vida cotidiana, es preocupante hoy en día como el ecosistema de nuestro planeta se va degradando producto de la contaminación por derrame de hidrocarburos derivados del petróleo por parte de las refinerías.

Durante más de cuatro décadas² la explotación petrolera lleva causando destrucción en la amazonia. En una concesión petrolera llamada lote 192, que llevan ya más de 40 años explorando y explotando unas 500 000 hectáreas de selva. El resultado es tan devastador, que en Loreto cuatro cuencas fueron declaradas en emergencia ambiental y sanitaria.²

Un informe de la Comisión del Congreso del Perú demostró que la contaminación está afectando la alimentación local y la capacidad de la gente para nutrirse, no a nivel de prosperar, sino a nivel de sobrevivir nomás. Los cultivos se están muriendo, el tamaño de la fruta está disminuyendo comparado con lo que se cosechaba hace 40 años.²

La biorremediación es una tecnología basada en la utilización de los microorganismos y su potencial degradador para eliminar los contaminantes del medio, mediante su transformación en productos inocuos como el CO₂ y

el H₂O, de todos los contaminantes los hidrocarburos son los que muestran mejores resultados con respecto a la biorremediación con un proceso microbiano.³

1.1 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

En el Perú y en el mundo existen refinerías de petróleo que producen compuestos derivados que son producidos y transportados para su uso en diferentes actividades industriales, (grifos, cisternas y otros) que contaminan el suelo a pesar del cuidado que se puede tener en el manejo, almacenamiento y dispensación, existe la posibilidad de que estos compuestos ingresen al suelo en cantidades y contaminar suelos.

En el país sobre estos suelos contaminados, no existe información estadística oficial sobre la ubicación y extensión de las áreas afectadas y su disposición adecuada de los productos y residuos de la industria del petróleo, a pesar de la álgida tarea del Ministerio de Energía y Minas (MEM), autoridad competente para las actividades petroleras en nuestro país.

Esto es un problema muy importante que requiere que los suelos contaminados con hidrocarburos sean remediados con tecnología de bajo costo y de fácil acceso y evitar la contaminación de aguas subterráneas, el Ministerio de Energía y Minas en su “Guía ambiental para la restauración de suelos en instalaciones de refinación y producción petrolera” apoya y estimula el empleo de diferentes técnicas para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos, entre las que se encuentran la biorremediación.

La tecnología de biorremediación de suelos es factible especialmente con materia prima simple como estiércol, aserrín, cuyos costos de remediación son bajos.

1.1.1 Formulación de Problema

¿Será factible la biodegradación de petróleo en suelos contaminados utilizando colonias bacterianas presentes en el estiércol de gallinas blancas de la cepa leghorn, empleando como planta indicadora a la *Triticum aestivum* "Trigo"?

1.2 OBJETIVOS :

1.2.1 Objetivo General

- Determinar colonias bacterianas presentes en el estiércol de gallinas blancas de la cepa leghorn responsables de la biodegradación de petróleo en suelos contaminados.

1.2.2 Objetivos específicos:

1. Aislar e identificar colonias bacterianas presentes en el estiércol de las gallinas blancas de la cepa leghorn.
2. Evaluar las variaciones de crecimiento de la planta *Triticum aestivum*. "Trigo" con relación a la concentración de microorganismos presentes en el estiércol de las gallinas blancas de la cepa leghorn.
3. Determinar la temperatura en el proceso de biodegradación de petróleo en suelos contaminados con hidrocarburos.
4. Determinar el pH, en el proceso de biodegradación de petróleo en suelos contaminados con hidrocarburos.
5. Demostrar la biodegradación del hidrocarburo en los suelos, por las colonias bacterianas presentes en el estiércol de las gallinas.

1.3 HIPÓTESIS

1.3.1 Hipótesis General

Las colonias bacterianas presentes en el estiércol de gallinas blancas de la cepa leghorn son responsables de la biodegradación del petróleo en suelos contaminados con hidrocarburos.

1.4 VARIABLES

1.4.1 Variable Dependiente

- Biorremediación a base de estiércol de gallina blanca de la cepa leghorn y aserrín tomando como indicador la planta *triticum aestivum* (altura y peso de la planta)

1.4.2 Variables Independientes

- Muestra de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo

II. GENERALIDADES

2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION

2.1.1 Antecedentes Internacionales

En Argentina realizaron el estudio “Biodegradación de Hidrocarburos en Fondos de Tanques de la industria Petrolera”, de diseño experimental cuyo objetivo fue biorremediar suelos contaminados que incluye el uso de bacterias degradadoras de petróleo con un predominio de los género *Pseudomonas sp.* Y *Rhodococcus sp* que a condiciones de 20% de humedad, oxigenación y nutrientes en proporciones 100: 03: 03 redujeron los hidrocarburos de 2.9% a 0,4 % la degradación se produjo mayoritariamente entre los hidrocarburos alifáticos de cadena entre 13 a 26 átomos de carbono, la fracción aromáticas presento baja degradación.⁴

En México realizaron el estudio “Biorremediación de suelo contaminado con 75000 ppm de aceite residual automotriz (ARA) por bioestimulación y fitorremediación con *Sorghum vulgare* y *Bacillus cereus* y/o *Burkholderia cepacia*” de tipo experimental, descriptivo. Cuyo objetivo fue biorremediar un suelo contaminado con 75000 ppm de (ARA) por doble y secuencial bioestimulación y posterior fitorremediación con *S. vulgare* y bacterias promotoras de crecimiento vegetal; donde mencionan que el suelo contaminado con aceite residual automotriz se biorremedió por bioestimulación primero con solución mineral, una segunda bioestimulación con *Phaseolus vulgaris* y las bacterias promotoras de crecimiento vegetal para minimizar el ARA. Los resultados indicaron que la Biorremediación del suelo por doble y secuencial bioestimulación con solución mineral el ARA decreció a 32500 ppm/30 días y con *P. vulgaris*; lo disminuyó hasta 10100 ppm/90 días. Su fitorremediación para minimizar el ARA remanente con *S. vulgare* y bacterias promotoras de crecimiento bacteriano a floración lo redujo a 2500 ppm a 800 ppm. Ello apoya que bioestimar un suelo impactado con elevada concentración de ARA; la

mejor es la integración de Biorremediación y la fitorremediación que su aplicación por separado.⁵

En México realizaron el estudio “Biorremediación con *Sorghum bicolor* inoculado con *Burkholderia cepacia* y *Penicillium chrysogenum*” de tipo experimental, descriptivo. Cuyo objetivos fue biorremediar suelo contaminado con 55000 y 65000 ppm de aceite residual automotriz (ARA) por bioestimulación y fitorremediación con *Sorghum bicolor* inoculado con *Burkholderia cepacia* y *Penicillium chrysogenum* NOM-138 SEMARNAT/SS – 2003. Así en el suelo la bioestimulación con una solución mineral y Vicia sativa como abono verde redujeron el ARA de 55000 a 33400 ppm y de 65000 a 24300 ppm. Posteriormente la fitorremediación con *S. bicolor* con *B. cepacia* y *P. chrysogenum* y microorganismos promotores de crecimiento bacteriano, el ARA decreció de 33400 ppm a 210 ppm y de 24300 a 360 ppm, ambos valores inferiores al máximo permisible por NOM-138 SEMARNAT/SS-2013. Comparado con el mismo suelo control negativo con ARA, sin biorremediación y fitorremediación, ahí la atenuación natural no cambio la cantidad de ARA, lo anterior apoya la integración de la biorremediación y fitorremediación en suelo impactado con elevadas concentraciones de ARA, como una opción ecológica en sustitución de remediación química costosa y contaminante.⁶

En Argentina realizaron el estudio “Estudio comparativo del agregado de enmiendas orgánicas e inorgánicas en procesos de biorremediación de suelos norpatagónicos contaminados con petróleo” el presente trabajo se realizó a escala de laboratorio, analizaron la eficacia del agregado de biosólidos y compost de biosólidos en comparación a los métodos convencionales de biorremediación en suelos norpatagónicos contaminados con petróleo. Estudiaron la velocidad de biodegradación de los hidrocarburos mediante la aplicación de biosólidos y compost de biosólidos versus tratamientos usuales de biorremediación: aporte de fertilizantes sintéticos y laboreo, aireación y humectación. Los resultados obtenidos muestran diferencias estadísticamente significativas en las velocidades de degradación biosólidos > compost de biosólidos >

fertilizantes sintéticos > laboreo y humectación. Los hidrocarburos de fracción pesada considerados resistentes a la biodegradación, mostraron las mayores reducciones siendo el tratamiento con biosólidos el más efectivo. Los hidrocarburos aromáticos de menor peso molecular, usualmente llamados BTEX, fueron eliminados rápidamente debido a procesos de volatilización y degradación biológica, el agregado de enmiendas orgánicas optimiza la actividad microbiana produciendo mayor degradación del petróleo respecto a los tratamientos convencionales de biorremediación en este tipo de suelos.⁷

En Brasil en el 2013 realizaron el estudio “Biorremediación de un suelo tropical contaminado con residuos aceitosos intemperizados” en este trabajo se evaluó la biorremediación de un suelo de clima tropical, contaminado con residuos aceitosos intemperizados. Fueron ensayados tres concentraciones de hidrocarburos totales de petróleo iniciales 15.3, 19.0 y 29.2 g/kg de suelo. Los ensayos fueron llevados a cabo en 60 días, monitoreando los siguientes parámetros: Humedad, pH, concentración de bacterias heterotróficas totales, hongos totales, hidrocarburos totales de petróleo e hidrocarburos aromáticos policíclicos, benzopireno y criseno. La concentración inicial de los hidrocarburos totales de petróleo influencio inversamente la biodegradación 84, 72 y 55% respectivamente en 60 días. El aumento de la concentración inicial de hidrocarburos totales de petróleo también influencio negativamente la degradación del criseno, no siendo observado efecto alguno con la degradación de benzopireno.⁸

2.1.2 Antecedentes Nacionales

En Lima realizó el estudio “Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos utilizando compost de aserrín y estiércol”. Realizado a nivel de bioensayo, en el Laboratorio de Fertilidad de suelos de la Universidad Nacional Agraria La Molina, aplicándose el modelo estadístico de Diseño Experimental Completamente al Azar (DCA), con tres repeticiones y doce tratamientos sumando un total de 36 macetas experimentales, para lo cual se empleó estiércol y aserrines como sustrato a la planta indicadora de “maíz” (*Zea mays L.*), sembrados y controlados por un periodo de dos

meses. Los resultados de la dosificación del suelo contaminado por hidrocarburos, estiércol y aserrín en promedio disminuyó 22.5% el contenido de hidrocarburos en el suelo, empleando solo estiércol disminuyó 16.5% y usando solamente aserrines disminuyó 9.6%. Comparando los tratamientos del experimento el que mejor ha remediado los suelos fue el tratamiento (T3) suelo contaminado más vacaza más aserrín de bolaina, puesto que la concentración inicial de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) fue de 21.81 gr de TPH/kg de suelo, ha disminuido en 16.28 gr de TPH/kg de suelo, que representa una reducción del 25%. Siendo este tratamiento lo más recomendable a usar.⁹

En Trujillo Se procedió a aislar cultivos bacterianos de suelos de Oleo centros. Las muestras de suelo recolectadas de aproximadamente 20 cm de profundidad fueron sometidas a incubación de pre-enriquecimiento por 5 días con petróleo al 0.5 % e incubados a temperatura ambiente. Luego se prepararon diluciones seriadas hasta 10⁻² y fueron sembradas 0,1 ml de las dos últimas diluciones en agar nutritivo por el método de superficie con asa de Drigalsky. La población heterótrofa aislada se caracterizó por formar colonias blancas, planas, algo extendidas, bordes aserrados y con un brillo metálico; otras colonias de color amarillo, secas, duras. Estos hallazgos preliminares permitieron continuar con los ensayos correspondientes a una selección secundaria en cultivo sumergido que se hizo en tubo con caldo de soya triptica, sales biliares y petróleo al 1%, seleccionándose los cultivos que mostraron crecimiento expresado en turbidez del medio a 37°C por 48 horas, siendo subcultivados en medio fresco e incubados en las mismas condiciones; finalmente se sembraron en caldo mínimo de sales más petróleo 1 % y solo 5 cultivos tuvieron crecimiento. Al evaluar su comportamiento bioquímico mediante las pruebas indican una identificación preliminar que son bacilos pequeños, aerobios, Gram negativos, catalasa y citrato positivo y crecimiento en caldo nutritivo a 42° C; características que corresponden al género *Pseudomonas* en cada una de las muestras analizadas, resaltando su capacidad de crecer en el ambientes contaminados con petróleo en las condiciones ensayadas; se destaca la viabilidad de la bacteria en las

muestras recolectadas así como después de evaluar su crecimiento con petróleo en medio sumergido, proponiendo su evaluación posterior en birreactores agitados.¹⁰

2.2 PETRÓLEO

El petróleo es el producto de la degradación anaeróbica de materia orgánica, durante largos períodos de tiempo y bajo condiciones de alta presión y temperatura, que la convierte en gas natural, crudo y derivados del petróleo. El petróleo crudo es una mezcla extremadamente compleja y variable de compuestos orgánicos, donde la mayoría de los ellos son hidrocarburos, que varían en peso molecular desde el gas metano hasta los altos pesos moleculares de alquitranes y bitúmenes. Estos hidrocarburos pueden presentarse en un amplio rango de estructuras moleculares: cadenas lineales y ramificadas, anillos sencillos, condensados o aromáticos. Dentro de los compuestos saturados están los de cadena lineal n - alcanos o n -parafinas, en las ramificadas algunos alcanos con cadenas alquílicas, las cicloparafinas, cicloalcanos o naftenos y los hópanos. Los dos grupos principales de hidrocarburos aromáticos son los monocíclicos, el benceno, tolueno, xileno y los hidrocarburos policíclicos tales como el naftaleno, antraceno y fenantreno.¹¹

2.2.1 Composición del crudo de petróleo

El también llamado “oro negro” se debe este apelativo a su característica principal, un líquido viscoso de color negro, el cual posee una vasta diversidad de compuestos, de los cuales resalta la familia de los hidrocarburos¹², la cual comprende la mayoría de la composición del crudo ya que constituye entre un 50 – 98 % del mismo, en tal virtud, su aspecto contaminante es devastador.¹³

Los principales componentes del crudo de petróleo se subdividen y purifican en diferentes fracciones, como se aprecia a continuación:

1. Fracción saturada: n-alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas y las cicloparafinas.
2. Fracción aromática: diaromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos
3. Fracción de resinas
4. Fracción de asfáltenos, estos últimos son compuestos más polares y menos abundantes, habiendo también hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados y agregados con alto peso molecular.¹⁴

2.2.2 Refinado del crudo de petróleo

Para comprender la naturaleza química de los diferentes derivados del petróleo que potencialmente pueden ser contaminantes en el medio ambiente, hay que entender el proceso de refinado del crudo utilizado para la obtención de estos productos petrolíferos.

La refinación del crudo consiste en la separación del crudo en diferentes fracciones las cuales serán transformadas selectivamente de acuerdo a la demanda de sus productos finales, tanto en cantidad como en calidad. Ciertas fracciones deben someterse a tratamientos térmicos y químicos para mejorar su estructura; por ende, su utilidad, como es el caso de las gasolinas y grasas.

La separación involucra el transporte por tuberías del crudo a través de hornos, dando como resultados líquidos y vapores los cuales pasan hasta las torres de destilación. Estas columnas están calientes en el fondo y a medida que se eleva de la torre, la temperatura disminuye. El crudo de petróleo se separa entonces en fracciones de acuerdo al peso molecular y punto de ebullición. Las fracciones más livianas, como la gasolina y gas, se vaporizan y elevan hasta la parte más alta de la columna. Los querosenos y diesel se mantienen en la mitad de la torre; los líquidos pesados como gasoil y aceites lubricantes se separan en la parte baja y por último, el residuo que son las fracciones más pesadas y que tienen un punto de ebullición más alto, se asientan al fondo de la columna. Este

residuo se destila nuevamente al vacío para obtener otro tipo de aceites lubricantes, ceras, parafinas y betunes asfálticos (alquitranes).

El hidrocarburo de petróleo crudo y sus productos refinados pueden dividirse en cuatro grupos¹⁵:

1. Hidrocarburos alifáticos
2. Hidrocarburos cíclicos
3. Hidrocarburos aromáticos
4. Compuestos orgánicos polares

Hidrocarburos alifáticos o de cadena abierta se dividen a su vez en tres grupos, en función del enlace entre dos átomos de carbono: alcanos (enlace simple), alquenos (enlace doble) y alquinos (enlace triple). Los compuestos alifáticos más comunes son los alcanos, los cuales se pueden encontrar en el petróleo crudo conformando cadenas de cinco a más de treinta y cinco átomos de carbono.¹⁵

Hidrocarburos cíclicos son también componentes comunes del petróleo y pueden tener estructuras mono cíclicos, bicíclicos o de más anillos, los hidrocarburos aromáticos incluyen compuestos mono aromáticos como el benceno, el tolueno y compuestos poliaromáticos como el pireno. En este grupo se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos moléculas formadas por múltiples anillos aromáticos representan entre el 0,2 % al 7 % del petróleo crudo.¹⁵

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos poseen una limitada solubilidad en agua se absorben fuertemente al suelo y se degradan a velocidades menores que los hidrocarburos que los hidrocarburos mono aromáticos y hidrocarburos alifáticos.

Compuestos orgánicos polares está constituido por compuestos que contienen átomos polares de sulfuro, oxígeno y nitrógeno. Esta fracción no es tan representativa y en el caso del nitrógeno su concentración es menor al 1%.

Además de los compuestos mencionados, el petróleo puede contener concentraciones variables de metales pesados tales como arsénico, mercurio, níquel, plomo y zinc.¹⁵

Las fracciones obtenidas pasan a otras áreas de la refinería; algunas fracciones requieren un procesamiento adicional, sin embargo la mayor parte de las moléculas requieren un procesamiento mayor para que se conviertan en productos de valor superior.

De esta manera, la composición química de cada producto varía de acuerdo al grado de punto de ebullición.

Tabla 1. Fracciones que se pueden obtener durante el proceso de destilación fraccionada de un crudo de petróleo.¹⁵

Fracción	Punto de Ebullición (°C)	Composición aproximada	Usos
Gas licuado	-160	C ₁ – C ₄	Gas domestico
Gasolina ligera	20 – 100	C ₅ H ₁₂ – C ₇ H ₁₆	Disolvente
Bencina	70 – 90	C ₆ – C ₇	Limpieza en seco
Gasolina	20 – 180	C ₆ – C ₁₁	Carburante motores
Keroseno, Jet fuel	200 – 300	C ₁₂ – C ₁₆	Iluminación y carburante
Gasoil, Diesel	200 – 350	C ₁₃ – C ₁₈	Carburante
Aceite lubricante	200 – 350	C ₁₆ – C ₂₀	Lubricante
Grasas, vaselinas	250 – 400	C ₁₈ – C ₂₂	Farmacéutica
Cera de parafina	245 – 540	C ₂₀ – C ₄₅	Velas
Betún asfáltico 35% peso	> 540	C ₃₀ – C ₄₅	Alquitrán asfáltico coque de petróleo

Fuente: Tomado de: Bocángel C. Evaluación de la eficacia de un consorcio bacteriano aislado en la base peruana “Machu Picchu” – Antártida en la biorremediación de suelos contaminados. [Tesis de Grado]. Perú Facultad de ciencias biológicas: 2016.

2.2.3 Tratamiento de petróleo y sus derivados

El crudo de petróleo es una importante fuente de energía, pero una fuente común de contaminación ambiental.¹⁶ Una de las consecuencias de la explotación de petróleo crudo y de las actividades de procesamiento, es

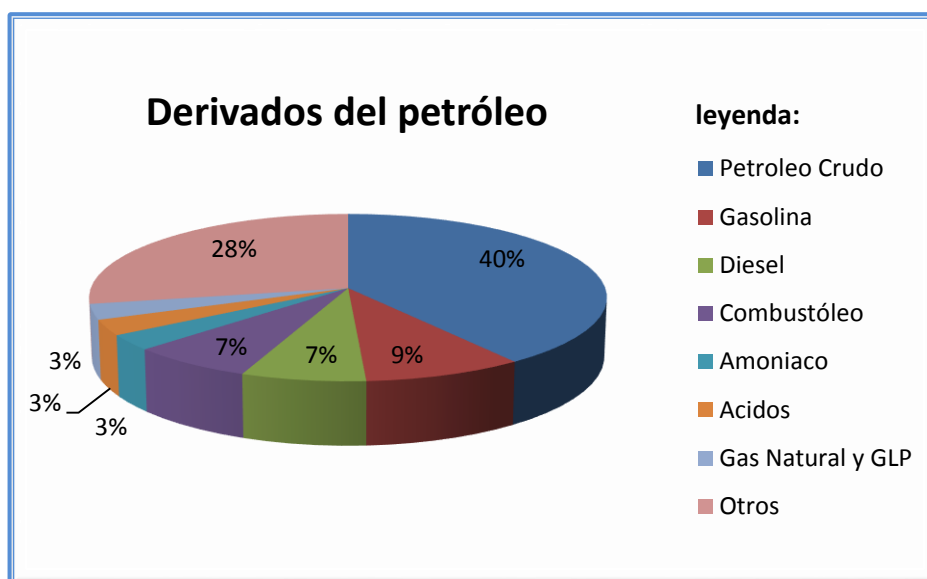
la generación de grandes cantidades de lodos aceitosos.¹⁷ El lodo aceitoso, que es parte de basura más importante en las refinerías de petróleo, se genera por la coalescencia de hidrocarburos en partículas sólidas.¹⁸

El lodo aceitoso residual, es una mezcla espesa, viscosa de sedimentos, agua, petróleo y una alta concentración de hidrocarburos, encontrado durante la refinación del crudo de petróleo, la limpieza de los tanques tanto de almacenamiento de petróleo como de tratamiento de aguas residuales de la refinería.¹⁹

Los hidrocarburos ingresan al suelo por la filtración o derrame de un tanque de almacenamiento de petróleo o de un oleoducto, ocurren diferentes procesos que influyen en el destino de estos compuestos en el suelo. Los hidrocarburos pueden propagarse lateralmente en la superficie del suelo o pueden penetrar verticalmente por efecto de la fuerza de gravedad y la capilaridad. En el primer caso se favorece la volatilización de los componentes de bajo peso molecular pero se incrementa el área contaminada y la foto oxidación de los hidrocarburos a compuestos polares más tóxicos. En el segundo caso, a mayor profundidad (lixiviación) se reduce la disponibilidad de oxígeno para la biodegradación y se incrementa el riesgo de contaminar la napa freática. La gran mayoría de hidrocarburos tiene un desplazamiento vertical en los suelos, a excepción de aquellos donde las condiciones climáticas favorecen su saturación con agua o su congelamiento.²⁰

Dentro de los compuestos peligrosos más comunes involucrados en emergencias ambientales, se encuentran el petróleo y sus derivados (gasolinas, diesel).²¹

Grafico 1. Distribución de los principales derivados del petróleo.



Fuente: Tomado de: Ocampo J. El compostaje como método de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. [Tesis de Grado]. Perú UNALM: 2014.

2.2.4 Impacto de los Hidrocarburos en el suelo.

El suelo es un cuerpo natural que es parte integrante del escenario donde ocurren los ciclos biogeoquímicos, hidrológicos y de la cadena alimentaria. Asimismo, es el espacio donde se realizan actividades agrícolas y ganaderas, y es la base para el establecimiento de áreas verdes.⁹

El suelo es un recurso natural complejo, dinámico y su equilibrio depende de la interacción entre sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Los factores que afectan la distribución de los hidrocarburos en los suelos son el volumen del derrame, la viscosidad del petróleo a la temperatura prevaleciente en el ambiente y la composición del suelo. Los compuestos de alta viscosidad como el crudo pesado tienden a moverse horizontalmente, mientras que la gasolina y aceites de baja viscosidad penetran fácilmente en el suelo.²²

El paso de los hidrocarburos a través de la matriz del suelo (lixiviación) depende a su vez de la textura del suelo y la solubilidad de los hidrocarburos en agua. En suelos arcillosos la migración de partículas es más rápida que en suelos francos, dado que los primeros tienen una mayor

porosidad. Además, en suelos muy arcillosos las moléculas polares pueden ser adsorbidas. Menos del 5% de los compuestos del crudo o productos refinados (principalmente aromáticos de bajo peso molecular e hidrocarburos polares) son solubles en agua.²¹ Luego, gran parte de los hidrocarburos queda retenida en el suelo. La actividad microbiana transforma los hidrocarburos en metabolitos más solubles y por lo tanto más móviles en el suelo, favoreciendo su solubilización y lixiviación.²²

El ingreso de hidrocarburos al suelo tiende a producir un efecto de hidrofobicidad, lo que resulta en la disminución de la tasa de infiltración. Los hidrocarburos se acumulan en los poros que se forman entre las partículas del suelo produciéndose una reducción en la disponibilidad de oxígeno y la permeabilidad. Reporta cambios en la textura de un suelo arcilloso a migajón arcilloso, a concentraciones de 150 mil ppm de combustóleo, por aumento importante de las arenas y disminución de las arcillas, observando además incrementos importantes en la concentración de materia orgánica a mayor concentración de gasolina y combustóleo. El mismo autor también señala que el incremento de este parámetro se debe principalmente a la presencia de material patogénico recalcitrante, lo cual puede representar un riesgo ecotóxico. Para los parámetros pH, conductividad eléctrica y densidad aparente el mismo autor no reporta variaciones significativas para suelos arcillosos contaminados con diferentes concentraciones de diesel, combustóleo y gasolina.²³

2.2.5 Impacto de los hidrocarburos en las plantas

En la gran mayoría de los hidrocarburos de petróleo son considerados compuestos tóxicos. Los efectos de estos compuestos sobre las plantas son en la mayoría de los casos sub letales, es decir que no se manifiestan a través de la mortalidad, sino de manera indirecta modificando el crecimiento, la reproducción y la fotosíntesis. Los efectos adversos sobre el desarrollo de las plantas varían en función de la estructura química del hidrocarburo, su concentración en el suelo y la especie de planta. La toxicidad disminuye en el siguiente orden: compuestos aromáticos, naftalenos, olefinas y cadenas no ramificadas parafínicas. Altas

concentraciones de hidrocarburos limitan y/o alteran la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas.²⁴

2.2.6 Impacto de los hidrocarburos en las semillas

Los hidrocarburos de petróleo pueden ingresar a las semillas y alterar las reacciones metabólicas y/o matar al embrión por toxicidad directa aguda. La inhibición de la germinación también está correlacionada con las propiedades hidrofóbicas de los hidrocarburos, las cuales evitan o reducen el intercambio de gases y agua necesario en esta etapa. Evaluaciones sobre la fitotoxicidad de hidrocarburos señalan que la respuesta a la presencia de hidrocarburos durante la germinación varía de una especie y otra. El mismo autor señala que la resistencia de semilla de algunas especies vegetales a los efectos de los hidrocarburos muestra el siguiente orden decreciente: girasol, frejol, trigo, trébol, maíz, cebada, lechuga. También indica que la incidencia de infecciones por hongos incrementa conforme aumenta la concentración de hidrocarburos.²⁴

Los suelos contaminados con petróleo pueden ser tratados por diferentes medios y aplicaciones. Existen reportes de tratamientos físicos por acción térmica o procesos químicos.²⁵ Sin embargo, estos tratamientos no solo son demasiado costosos, sino que son propensos a requerir un ciclo prolongado de tiempo,²⁶ así que la opción de tratamiento sería la aplicación microbiológica. La biodegradación puede ser una efectiva y económica vía para remediar suelos que contengan hidrocarburos aromáticos policíclicos y otros compuestos hidrocarbonados.²⁷

2.3 BIORREMEDIACION

La biorremediación se refiere a la restauración de un sitio, a través de la eliminación de contaminantes orgánicos gracias a la acción de microorganismos. Es un proceso que explota la versatilidad metabólica natural de microorganismos para degradar los contaminantes ambientales. En la actualidad, la biorremediación gira en torno a cualquier mecanismo para estimular las poblaciones microbianas indígenas, ya sea por parte de modificaciones ambientales o por la introducción de las

poblaciones exógenas que son reconocidos como degradadores de un sitio contaminado, un proceso conocido como siembra.

La biorremediación potencialmente ofrece una serie de ventajas tales como la destrucción de contaminantes, los costos de tratamiento más bajas, una mayor seguridad y menos perturbación ambiental.

La complejidad de la biorremediación radica en que, por lo general, las cepas microbianas son capaces de degradar únicamente ciertos compuestos de hidrocarburos específicos; los residuos de lodos aceitosos contienen mezclas complejas con diferentes tipos de hidrocarburos aromáticos policíclicos por no mencionar los alcanos, compuestos de nitrógeno, azufre y oxígeno, además de fracciones de resinas.²⁸

Es así que una especie bacteriana por sí sola, dispone de una capacidad limitada para degradar todas las fracciones de hidrocarburos presentes.²⁹

Por lo tanto es necesario crear una mezcla de cepas microbiológicas, conocido como consorcio microbiológico, a fin de que puedan degradar una amplia gama de los componentes de hidrocarburos presentes en los subproductos del petróleo, particularmente en el ámbito ambiental, en los desechos aceitosos y lodos aceitosos. Resulta esencial la aplicación de comunidades microbiológicas nativas del lugar a remediar ya que los microorganismos nativos pueden degradar contaminantes al tener mayor tolerancia a la toxicidad, en contraste a otras especies microbiológicas introducidas externamente.³⁰

2.3.1 Factores que influyen en la biodegradación

A fin de degradar biológicamente de manera óptima los hidrocarburos presentes en el petróleo, es necesario comprender los mecanismos de manipulación de las actividades microbianas. Para todos los residuos que contengan grandes cantidades de hidrocarburos, los microorganismos deben ser capaces de utilizar estos hidrocarburos como sustratos, para esto, deben ser capaces de sintetizar enzimas que catalicen la reacción en la que estos contaminantes se degraden hasta una forma más simple con cadenas moleculares más bajas y a su vez, compuestos menos tóxicos (CO_2 y H_2O) obteniendo los nutrientes y energía necesaria para su supervivencia en el proceso.³¹

Otros factores que influyen en la biodegradación son:

1. Temperatura
2. Concentración de Hidrocarburos
3. Oxígeno
4. Nutrientes
5. Estructura de suelo
6. Valor de pH

2.3.1.1 Temperatura

La temperatura tiene una influencia importante en la tasa de degradación de los hidrocarburos, debido a que el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos están en función de la misma. La USEPA (2003) indica que en el rango de 10 a 45°C, la actividad microbiana se duplica cada 10 °C, siendo el rango óptimo para el proceso de biorremediación.²³

2.3.1.2 Concentración de Hidrocarburos

La disponibilidad de hidrocarburos presentes en el suelo es un factor predominante para establecer el tiempo de recuperación y biorremediación del suelo a mayor cantidad de hidrocarburos en el suelo mayor será el tiempo de recuperación de este.

La alta concentración de hidrocarburos puede inhibir el crecimiento microbiológico, lo que ralentiza la tasa de remediación. A una concentración mayor de hidrocarburos puede llegar a ser muy tóxico para los microorganismos.²³

2.3.1.3 Oxígeno

La disponibilidad de oxígeno es necesaria para la bio-oxidación de los compuestos orgánicos. Las reacciones de oxidación son las de mayor importancia en la biodegradación de los hidrocarburos. Las condiciones aeróbicas se logran mediante el volteo mecánico de los suelos con maquinaria agrícola, evitando de esta manera que se formen zonas saturadas de agua por riego excesivo. El volteo de los suelos no solo introduce oxígeno al suelo sino que además redistribuye los nutrientes, contaminantes y microorganismos, favoreciendo la degradación de los contaminantes. La frecuencia de aireación del suelo dependerá del tipo de suelo y la concentración de contaminantes.²³

2.3.1.4 Nutrientes

Los microorganismos requieren de nutrientes inorgánicos como nitrógeno y fósforo para mantener su crecimiento. En general, se recomienda agregar nutrientes usando fertilizantes agrícolas comerciales como urea, nitrato de amonio o superfosfato triple. Dichos compuestos pueden adicionarse en solución junto con el riego o en forma seca incorporándose mediante el volteo de los suelos con la maquinaria agrícola. La dosificación de nitrógeno y fósforo se realiza en función de la concentración de contaminante de acuerdo a una relación que vincula C: N: P y que varía según los autores, la USEPA sugiere una relación 100:1.²

2.3.1.5 Estructura de suelo.

La textura del suelo afecta la permeabilidad, el contenido de humedad y la densidad del suelo. Para asegurar que la disponibilidad de oxígeno, la distribución de nutrientes y el contenido de humedad se mantengan en rangos efectivos para la biodegradación es importante conocer la textura, la estructura y composición de los suelos.³²

2.3.1.6 Valor de pH.

Para mantener el crecimiento de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, el pH del suelo debe tener valores en el rango de 6 - 8 (USEPA, 2003). Valores de pH mayores a 6,5 minimizan la solubilización y migración de los metales pesados y proveen las condiciones óptimas para la biodegradación. Si los suelos tuvieran valores de pH muy bajos se sugiere emplear cal como material encalante y estabilizar el pH del suelo.

2.3.2 Valores óptimos para el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Para poder realizar un proceso de biorremediación con éxito tenemos que considerar ciertos valores óptimos para el proceso de degradación del hidrocarburo del petróleo.

Tabla 2. Valores óptimos para el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de Petróleo.

ELEMENTO	NIVEL
Agua	40-80 %
pH	5.8-8
Temperatura	18 -32 ° C

Fuente: Tomado de: Buendia H. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol [Tesis de Grado]. Perú Universidad Mayor de San Marcos: 2012.

2.4 MICROORGANISMOS

La biodegradación de hidrocarburos en diferentes ecosistemas (suelo y agua) requiere de la presencia de microorganismos que a través de la actividad bioquímica, oxiden estos.

Algunas especies de microorganismos pueden metabolizar un número limitado de hidrocarburos, de manera que la presencia de poblaciones mixtas con diferentes capacidades metabólicas, es necesaria para degradar mezclas complejas de hidrocarburos como el crudo. La degradación de hidrocarburos se lleva a cabo principalmente por bacterias, seguidas por los hongos, levaduras y algas.

2.4.1 Bacterias

Las bacterias son el grupo de organismos más abundante en los suelos y la cantidad de especies presentes en el mismo parece relativamente constante alrededor del mundo, estos organismos llegan a presentarse en poblaciones de miles por gramo del suelo.³³

Algunas de las especies bacterianas con capacidad para degradar hidrocarburos son:

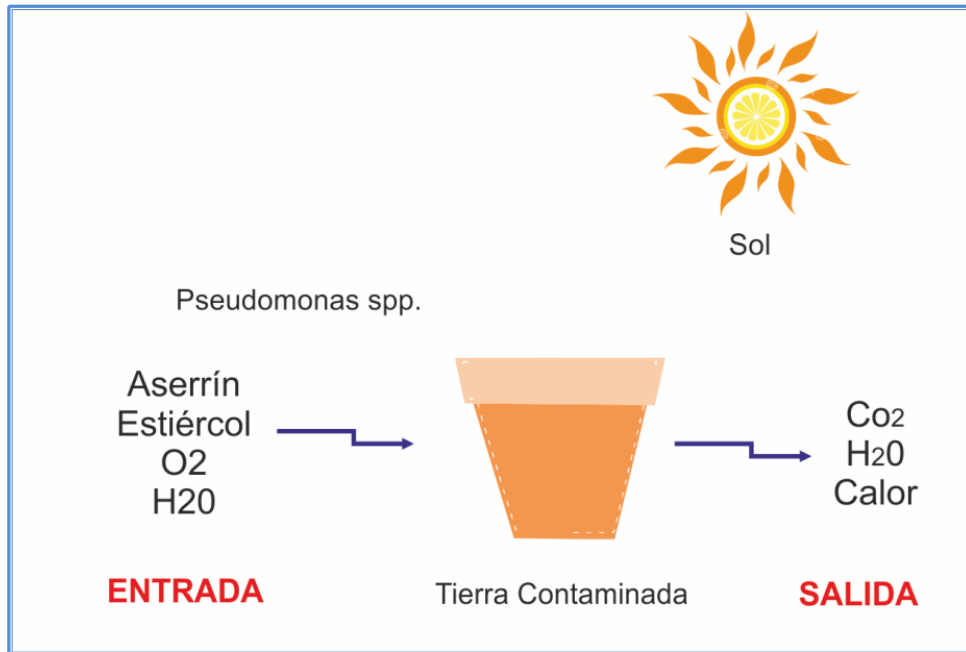
1. *Pseudomonas*
2. *Arthrobacter*
3. *Alcaligenes*
4. *Corynebacterium*
5. *Flavobacterium*
6. *Achromobacter*
7. *Micrococcus*

Las bacterias del género *pseudomonas*, son un grupo de microorganismos independientes y autosuficientes.

Las *pseudomonas*, son microorganismos benéficos de origen natural.

Estas bacterias sintetizan subsustancias útiles a partir de las secreciones de las raíces de la materia orgánica y/o gases nocivos (sulfuro de hidrogeno), usando la luz solar y el calor del suelo como fuente de energía.

Gráfico 2. El proceso de descomposición de la materia orgánica.⁹



Fuente: Tomado de: Buendía H. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol [Tesis de Grado]. Perú Universidad Mayor de San Marcos: 2012.

2.4.2 Hongos

Los hongos son protistas, no tienen movimiento y emplean materia orgánica como fuente de carbono y energía. Algunos de los hongos mejor conocidos son mohos, levaduras y setas.

En comparación con las bacterias, los hongos son menos numerosos y crecen a velocidades considerablemente bajas; además, los procesos metabólicos de éstos son menos diversos. Como grupo, los hongos tienden a ser más tolerantes a los ácidos que las bacterias (muchas especies crecen a un pH óptimo de 5 o menos) y son más sensibles a la variación en la humedad.

Algunas de las especies de hongos con capacidad para degradar hidrocarburos destacan:

1. *Aspergillus*
2. *Cephalosporium*
3. *Cunninghamella*
4. *Torulopsis*
5. *Trichoderma*
6. *Saccharomyces*

2.5 SUELOS

Se denomina suelo al sistema estructurado, biológicamente activo, que tiende a desarrollarse en la superficie de las tierras emergidas por la influencia de la intemperie y de los seres vivos. Se trata de un sistema formado por componentes minerales, componentes orgánicos (humus y derivados, biomasa viva y muerta), gas (aire en el espacio existente en los poros), y agua envolviendo partículas y el espacio capilar.¹¹

El suelo constituye la interfaz entre la tierra, el aire y el agua, lo que le confiere la capacidad de desempeñar tanto funciones naturales como de uso antropogénico. Las propiedades físicas y químicas de los suelos influyen en gran manera sobre la aireación, la disponibilidad de nutrientes y la retención de agua y, por lo tanto, en la actividad biológica. Las propiedades más importantes de las que engloban estos grupos son el tamaño de partícula, la porosidad, la humedad, estado de aireación, composición química, fracción de arcilla, capacidad de intercambio de cationes y fracción orgánica. El tamaño de partícula afecta a la química de la superficie de los suelos y al tamaño de los poros. La cantidad de poros depende de la textura, estructura y contenido de materia orgánica del suelo.¹¹

2.5.1 Características del suelo

El suelo puede estar compuesto principalmente por minerales, aire, agua, materia orgánica y organismos vivos. La fracción mineral constituye el principal componente estructural del suelo con un 50% del volumen total,

el agua y aire constituyen el volumen de poros entre el 25 y 50% en volumen, ya que su proporción varía con la humedad del suelo. La materia orgánica oscila entre el 3 y 6% de volumen, mientras que los organismos vivos ocupan menos del 1%.

2.5.2 Clasificación de suelos

El suelo puede ser clasificado considerando sus tres componentes principales: arcilla, limo y arena, las cuales difieren entre si principalmente por su tamaño.

El área superficial (área/volumen) de los diferentes tipos de partículas afectan directamente las propiedades físicas, químicas y biológicas de un suelo. Por su naturaleza principalmente coloidal, de carga negativa y forma plana, las arcillas constituyen el tipo de partícula que mayor efecto tienen sobre las propiedades del suelo, ya que son buenos absorbentes de agua, iones y gases. Las arenas no tienen gran actividad superficial, por lo que son asociadas principalmente con el tamaño de los poros del suelo, y por tanto con el movimiento del aire y del agua a través del mismo, sin afectar directamente las propiedades químicas y biológicas del suelo.¹¹

En general, los suelos con predominios de arenas suelen tener permeabilidad alta y baja capacidad de retención de agua. Por el contrario, los suelos con predominio de limos y arcilla suelen ser cohesivos y tener una capacidad de retención de agua alta y una baja permeabilidad, lo que supone una velocidad de infiltración y aireación bajas. Los suelos con predominio de limos pueden presentar formación de costras.¹¹

2.5.3 Beneficios del estiércol y aserrín

Los beneficios de la materia orgánica de origen animal y vegetal en las plantas son: ³⁴

1. Fuente de carbono y nitrógeno para los microorganismos
2. Aumento de vigor y crecimiento del tallo y raíces, desde la germinación hasta la emergencia de las plántulas.

3. Genera un mecanismo de supresión de insectos y enfermedades en las plantas, ya que pueden inducir la resistencia de los cultivos a enfermedades.
4. Incrementa el crecimiento, calidad y productividad de cultivos
5. Promueven la floración, fructificación y maduración por sus efectos hormonales en zonas meristemáticas.

Tabla 3. Condiciones deseables en el proceso de degradación de estiércol y aserrín.

Características	Rango Deseable	Rango Optimo
Relación Carbono/nitrógeno	20:1, 40:1	25:1,30:1
Contenido de Humedad	40-65%	50-60%
Concentración de Oxígeno	Mayor 5%	Mucho mayor al 5%
pH	5,5-9,0	6,5-8,5
Temperatura	30-40	30-35

Fuente: Tomado de: Buendia H. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol [Tesis de Grado]. Perú Universidad Mayor de San Marcos: 2012.

En lo referente a la humedad debe ser alta durante la etapa de descomposición, en la cual prevalecen las bacterias. Si la humedad decae por debajo del 35% la actividad microbiana desciende y el proceso se hace más lento, llegando finalmente a la inhibición del crecimiento bacteriológico.³²

Con respecto a la temperatura la descomposición microbiana libera gran cantidad de energía en forma de calor, lo cual incrementa la temperatura. Es necesario mantener una temperatura del proceso en el rango adecuado (30°C – 35 °C) por ello es importante la aireación.³⁵

En cuanto el oxígeno es necesario para la respiración de los microorganismos y el metabolismo aerobio, actúa como oxidante de las especies químicas orgánicas o inorgánicas presentes en el sustrato, se necesita como mínimo una concentración de 5 % de O₂ para que el proceso no se detenga y sea efectiva.³²

La aireación es necesaria y recomendable pero debe ser controlada, debido a que si esta es excesiva, puede provocar un enfriamiento de la mezcla de residuos y por ende una disminución en la actividad metabólica de los microorganismos. La aireación libera calor, vapor de agua y otros gases que se encuentran en el interior del suelo, además incorpora O₂.³⁶

El pH influye en el proceso de la descomposición de la materia orgánica a causa de su acción sobre los microorganismos:³⁶

- En general, los hongos toleran un amplio margen de pH, que va desde 5 hasta 8.
- El rango de pH cercano al neutro (6,5 – 7,5) asegura el desarrollo favorable de la gran mayoría de microorganismos
- El pH es importante cuando se utiliza materiales ricos en nitrógeno, ya que un pH mayor a 8.5 promueve la conversión de nitrógeno en amonio y puede perderse en el ambiente en forma de amonio.

2.6 Especies de plantas nativas reductoras de la concentración de hidrocarburos en suelos contaminados.

En áreas muy contaminadas se produce una selección de especies de plantas, surgiendo individuos de una misma especie tolerantes a la presencia de contaminantes que incluso, a niveles bajos de contaminación, tienen la capacidad de crecer y reducir concentraciones de hidrocarburos y otros contaminantes.²¹

En el siguiente cuadro se lista algunas plantas que pueden crecer en suelos con hidrocarburos de petróleo, pero que no presentan necesariamente un crecimiento y desarrollo adecuado, entre ellas está el *Triticum aestivum* “Trigo”

En el caso de las leguminosas su capacidad de fijar nitrógeno es su principal ventaja.

Tabla 4. Plantas reductoras de hidrocarburos de petróleo.

GRUPO DE PLANTAS REDUCTORES			
Nombre común	Nombre científico	Nombre común	Nombre científico
Pasto	<i>Agropyron smithi</i>	Pasto	<i>Cynodon dactylon</i>
Zanahoria	<i>Daucus carota</i>	Trigo	<i>Triticum aestivum</i>
Girasol	<i>Heliantus Annnus</i>	Pacay	<i>Inga feuilleei</i>
Col	<i>Festuca arundinacea</i>	Maíz	<i>Zea Maíz. L</i>
Soya	<i>Glycine max</i>	Pasto grama	<i>Panicum coloratun</i>

Fuente: Tomado de: Buendía H. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol [Tesis de Grado]. Perú Universidad Mayor de San Marcos: 2012.

Las plantas que crecen en los suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo pueden reducir la concentración de estos contaminantes mediante tres mecanismos: degradación, contención o transferencia.²¹

Existe poca evidencia sobre la degradación directa de los hidrocarburos de petróleo por las plantas. La vía de degradación de alcanos en las plantas pueden ser generalizada como:



Dónde:

C_nH_{2n+2} : Formula General de los alcanos (Hidrocarburos de cadena lineal)

O_2 : Oxígeno que proviene del medio ambiente

$CO_2 + H_2O$: Son los productos de la degradación de Hidrocarburos (Residual)

Fuente: Tomado de: Buendía H. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol [Tesis de Grado]. Perú Universidad Mayor de San Marcos: 2012.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 TIPO DE INVESTIGACION

El estudio realizado es de tipo descriptivo y experimental, el diseño es el modelo: Diseño en Bloques Completamente al Azar (DBCA), distribuido en 2 bloques, con 3 Tratamientos y 6 repeticiones haciendo un total de 36 unidades experimentales.

3.1.1 Análisis descriptivo

Elaboración de medidas y gráficos descriptivos.

3.1.2 Diseño de bloques completamente al azar

El estudio de la investigación es experimental y el diseño es un modelo completamente al Azar (DCA); el modelo aditivo lineal está dado por:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij} \quad i = 1, \dots, t$$

Ahora, dado que los tratamientos son generados por las combinaciones entre los niveles de dos factores, el efecto de los tratamientos se descompone en el efecto del factor A, el efecto del factor B y el efecto de la interacción entre los dos factores. Así, el modelo aditivo lineal para un factorial $p \times q$ en DBCA será:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + e_{ijk} \quad i = 1, \dots, p \quad j = 1, \dots, q \quad k = 1, \dots, r_{ij}$$

Dónde:

Y_{ijk} Es el valor o rendimiento observando con el i -ésimo nivel del factor A, j -ésimo nivel de factor B, K -ésima repetición.

μ Es el efecto de la media general

α_i Es el efecto del i -ésimo nivel del factor A.

β_j Es el efecto del j -ésimo nivel del factor B.

$(\alpha\beta)_{ij}$ Es el efecto de la interacción en el i -ésimo nivel del factor A, j -ésimo nivel del factor B.

e_{ijk} Es error experimental i -ésimo nivel del factor A, j -ésimo nivel del factor B, k -ésima repetición.

- p Es el número de niveles del factor A.
- q Es el número de niveles del factor B.
- Y_k Es el efecto del k-ésimo bloque
- b Es el número de bloques

Tabla 5. Cuadro ANOVA para un diseño en bloques completamente al Azar.

CUADRO ANOVA				
Fuentes de Variación	Grados de Libertad (GL)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados Medidos (CM)	Fc
Bloques	b-1	SC (bloques)	SC (Bloques) GL (Bloques)	
A	p-1	SC (A)	SC (A) GL (A)	CM (A) CM (Res)
B	q-1	SC (B)	SC (B) GL (B)	CM (B) CM (Res)
AB	(p-1) (q-1)	SC (AB)	SC (AB) GL (AB)	CM (AB) CM (Res)
Residuos	(pq-1) (b-1)	SC (Residuos)	SC (Res) GL (Res)	
Total	(pqb-1)	SC (Total)		

Coefficiente de Variabilidad: Es una medida que permite medir cuán homogéneo es el conjunto de unidades experimentales.

Prueba de Tukey: El método de Tukey se utiliza en ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los tratamientos.

3.1.3 Regresión Lineal Simple.

$$E(Y : X_i = x_i) = \beta_0 + \beta_1 x_1$$

3.2 AREA DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo en el distrito de San Juan de Lurigancho en la Av. Chosica Mz. M lote 10 La Nieveira. Referencia a dos cuadras de la refinería cajamarquilla

3.3 EQUIPOS, MATERIALES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

3.3.1 Equipos

- Balanza de precisión BOECO®
- Balanza eléctrica analítica SARTORIUS® 0,1 mg de sensibilidad
- Autoclave GREETMED®
- Estufa de Incubación DIGISYSTEM® (25 - 30 °C)
- Estufa de Incubación DIGISYSTEM® (20 - 25 °C)
- Estufa de calor seco DIGISYSTEM® (0 - 180 °C)
- Potenciómetro pH 0 a 14 HANNA INSTRUMENTS®
- Baño María BOECO®
- Cabina de Flujo Laminar Horizontal TELSTAR®
- Cabina de Flujo Laminar Vertical TELSTAR®
- Microscopio LABOMED®

3.3.2 Materiales

- Matraz Erlenmeyer 250 mL
- Matraz Erlenmeyer 500 mL
- Probeta de vidrio 100 mL
- Probeta de vidrio 250 mL
- Tubos de ensayo de 16 x 150 mm con tapa
- Tubos de ensayo de 40 x 400 mm con tapa
- Frascos de Vidrio 250 mL
- Placas Petri estéril
- Mango para asas de Kolle
- Asas de Kolle
- Cubre Objetos

- Porta Objeto
- Mechero bunsen
- Micropipeta automática de 10 µL - 100 µL
- Micropipeta automática de 100 µL - 1000 µL
- Piseta de plástico 250 mL
- Espátula de metal estéril
- Tijera de metal estéril
- Pipeta serológica de 1 mL
- Pipeta serológica de 2 mL
- Pipeta serológica de 5 mL
- Pipeta serológica de 10 mL
- Tips para Micropipeta automática de 10 µL - 100 µL
- Tips para Micropipeta automática de 100 µL - 1000 µL
- Gradilla para tubos de ensayo
- Espátula drigalsky
- Cámara de anaerobiosis
- Frascos de vidrio estéril para recojo de muestras

3.3.3 Medios de Cultivo

- Agar Digerido de Caseína y Soya (TSA) marca Merck®
- Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) marca Scharlab®
- Agar Manitol Salado (MSA) marca Merck®
- Agar Cetrinida (CEA) marca Merck®
- Agar Mac Conkey (MCA) marca Merck®
- Agar Xilosa – Lisina – Desoxicolato (XLA) marca Scharlab®
- Caldo Digerido de Caseína de Soya (TSB) marca Scharlab®
- Caldo Mac Conkey (MCB) marca Scharlab®
- Caldo Rappaport Vassiliadis (RVB) marca Scharlab®
- Medio de Tioglicolato fluido (TGB) marca Merck®

3.3.4 Reactivos

- Alcohol Acetona marca Merck®
- Safranina marca Merck®
- Lugol marca Merck®
- Cristal Violeta marca Merck®
- Solución Amortiguadora de Cloruro de Sodio – Peptona de pH 7,0 marca Merck®
- Solución Amortiguadora de Fosfato de pH 7,2 marca Merck®

3.4 METODOS

3.4.1 Recolección de muestras

Se recolectó 40 muestras de 1 kilogramo de suelo no contaminado en bolsas plásticas inertes de 1000 g. de capacidad. Que posteriormente fue cambiado y empaquetado en papel Kraft para su esterilización por calor seco a 180 ° C durante 30 minutos luego se almacenó las muestras en un envase de plástico, hasta realizar la prueba de esterilidad según la farmacopea de los Estados Unidos USP 39 NF 34.³⁷

Luego de realizar y obtener los resultados de la prueba de esterilidad se procedió a contaminar intencionalmente el suelo con 250 mL de petróleo proveniente de la refinería Cajamarquilla para su posterior biorremediación.



Figura 1. Recolección de muestra de suelo sin contaminar.

3.4.2 Conservación, Transporte de la muestra

Para la conservación y el transporte se utilizó un envase de plástico, en el cual se lacro de manera adecuada para evitar la contaminación de las muestras. Se colocó en el envase la etiqueta correspondiente indicando el número de muestra, origen y fecha.

3.4.3 Análisis de la tierra

Se realizó una prueba de esterilidad al suelo esterilizado, posteriormente se realizó una caracterización de suelo; análisis fisicoquímico en el Laboratorio de Agua y Suelo de la facultad de Ingeniería Agrícola de la Universidad Nacional La Molina y finalmente se realizó la identificación de hidrocarburos presentes en el suelo contaminado en el laboratorio ENVIROLAB.

3.4.3.1 Acondicionamiento del material

El ensayo de esterilidad se llevó a cabo en Laboratorios Medical Concept S.A.C. bajo condiciones estériles (dentro del Área Estéril), mediante el empleo de una cabina de flujo laminar, localizada en un ambiente limpio. Se tomó precauciones para evitar la contaminación externa, de manera que estas no afecten a los posibles

microorganismos presentes en la muestra y que deberían ser evidenciadas con el desarrollo del ensayo.

Todo material de vidrio, plástico y metal que se utilizó en este análisis fue totalmente estéril para evitar contaminaciones y falsos positivos.

3.4.3.2 Cantidad de muestras a utilizar

De las 40 muestras que se recolectó y esterilizó, se tomó 2 muestras al azar de las cuales se tomó un alícuota de 0,5 g. de cada muestra a analizar por duplicado.

3.4.3.3 Ensayo de esterilidad

Dentro de la cabina de flujo laminar, se abrió asépticamente los empaques de las muestras empleando tijeras y espátulas de metal totalmente estériles y extraemos una porción de 0,1 g. a 0,5 g. de la parte más interna de la muestra.

Transferimos (por duplicado) en forma aséptica una porción de 0,1 g. a 0,5 g. de muestra a frascos con tapa conteniendo 150 mL de medio Tioglicolato Fluido (TGB) y Caldo Digerido de Caseína de Soya (TSB).

Se incubó durante 14 días de $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en Medio TGB y a $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio TSB.

Durante el periodo de incubación y al momento de su finalización se examinó los medios en busca de evidencia macroscópica de crecimiento bacteriano (Turbidez)

Se llevaron controles negativos de cada uno de los medio utilizados para el ensayo.

Si no se hallan evidencias macroscópicas de crecimiento microbiano como desarrollo de turbidez y/o crecimiento superficial en los medios de cultivo, el producto examinado CUMPLE la prueba de esterilidad y se informa que la muestra analizada es CONFORME.

Si se hallan evidencias macroscópicas de crecimiento microbiano como desarrollo de turbidez y/o crecimiento superficial en los medios de cultivo, el producto examinado NO CUMPLE la prueba de esterilidad y se informa que la muestra analizada es NO CONFORME.

Si se encuentran evidencias macroscópicas de crecimiento microbiano y una revisión del proceso seguido durante la realización de la prueba de esterilidad indica que pudiera haber fallas en la técnica aséptica desarrollada, fallas encontradas en el monitoreo microbiológico del entorno de la prueba de esterilidad o fallas en los controles negativos y/o positivos, se puede declarar no válido el ensayo y repetir el procedimiento.

Los resultados se registraran como Estéril o No estéril.



Figura 2. Prueba de esterilidad a la muestra de suelo recolectado y esterilizado.

3.4.4 Caracterización del suelo (análisis fisicoquímico)

De las 38 muestras restantes se tomó una muestra al azar para determinar las principales características fisicoquímicas del suelo de cultivo totalmente estéril, entre ellas: Textura, Salinidad, Calcáreo Total, materia orgánica, Nitrógeno Total, fosforo disponible, Calcio, Magnesio, Potasio y pH mediante diversos análisis efectuados en el laboratorio de Agua y Suelo de la Facultad de Ingeniería Agrícola de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.4.5 Contaminación del suelo estéril con petróleo para su posterior biorremediación

De las 37 muestras restantes se cogieron 19 muestras al azar y se contaminaron con 250 mL de petróleo proveniente de la refinería de Cajamarquilla cada muestra.

Posteriormente se realizó el análisis fisicoquímico y determinación de hidrocarburos en el suelo contaminado.

3.4.6 Análisis fisicoquímico y determinación de hidrocarburos en el suelo contaminado.

De las 19 muestras contaminadas se tomó una muestra al azar para determinar la composición de hidrocarburos totales presentes en los suelos contaminados según el procedimiento EPA 8015-C realizado por el laboratorio ENVIROLAB.³⁸

El informe Presentará el detalle de los hidrocarburos presentes en el suelo contaminado:

1. Hidrocarburos de petróleo – rango (C 28 – C 40)
2. Hidrocarburos de petróleo – rango (C 10 – C 28)
3. Hidrocarburos de petróleo – rango (C 6 – C 10)

El análisis fisicoquímico y determinación de hidrocarburos en el suelo contaminado se realizará al inicio y cada 6 días durante 180 días que duro el experimento.

3.4.7 Recuento de bacterias presentes en el suelo contaminado y suelo no contaminado con respecto a su tratamiento.

El recuento de microorganismos presentes en el suelo contaminado y no contaminado será según la farmacopea de los Estados Unidos USP 39 NF 34 .³⁹

Se pesó 1 g de la muestra de suelo y se agregó a 9 mL de solución salina al 0,85 % (dilución 10^{-1}), luego se pipeteo 1 mL de la dilución 10^{-1} y se pasó a un tubo que contenía 9 mL de solución salina (dilución 10^{-2}) y se continuó con el procedimiento en las mismas condiciones pasando 1 mL de tubo a tubo, hasta lograr un dilución 10^{-10} .

A partir de cada dilución se colocó con ayuda de la micropipeta 1 mL de cada dilución en una placa Petri que contenía Plate Count Agar, para recuento de bacterias aeróbicas mesófilas presentes en el suelo.

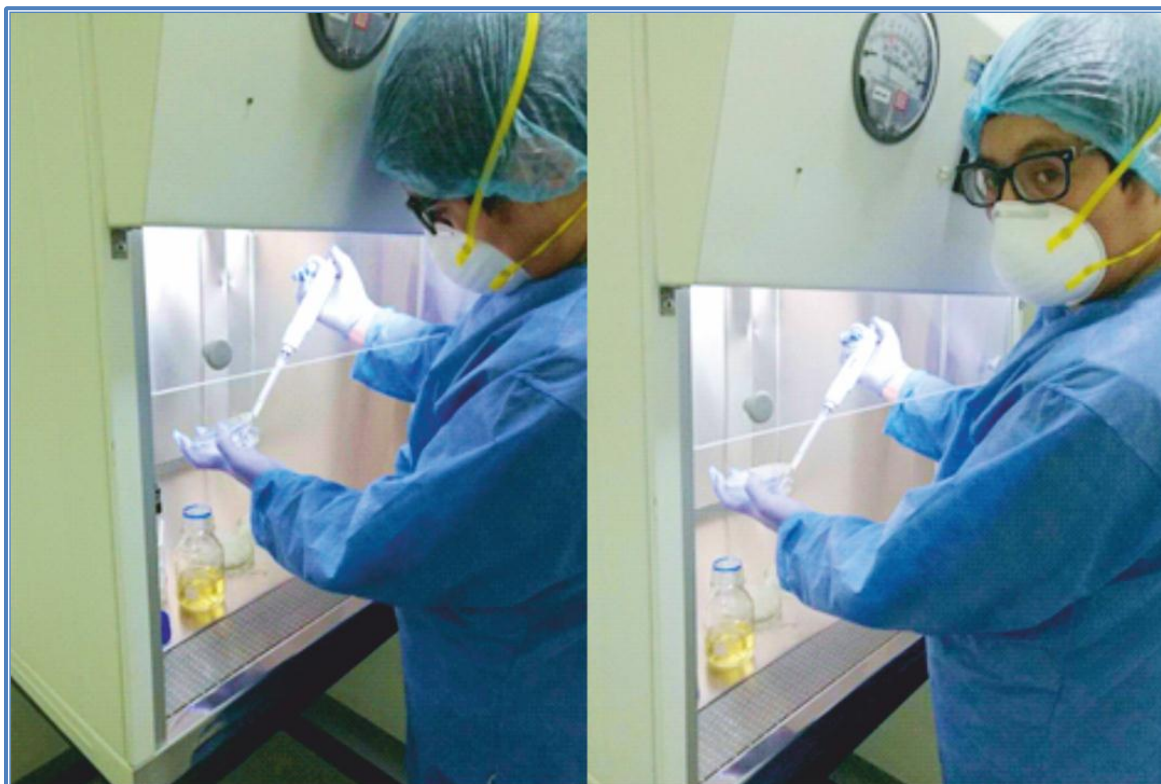


Figura 3. Recuento Microbiano de bacterias aeróbicas mesófilas en suelo contaminado y suelo no contaminado

3.4.8 Determinación de microorganismos específicos en la muestra de suelo contaminado y suelo no contaminado.

La determinación de microorganismos específicos en la muestra suelo contaminado y no contaminado será según la farmacopea de los Estados Unidos USP 39 NF 34 .⁴⁰

Se pesó 1 g de la muestra de suelo y se agregó a 9 mL de solución salina al 0,85 % (dilución 10^{-1}), luego se pipeteo 1 mL de la dilución 10^{-1} y se pasó a un tubo que contenía 9 mL de caldo digerido de caseína y soya posteriormente se incubo a 30 °C durante un periodo de 18 horas luego procedemos según el microorganismo a estudiar.

Escherichia Coli

Terminando el periodo de incubación se transfirió 0,1 mL de Caldo Digerido de Caseina y Soya a 10 mL de Caldo Mac Conkey.

Se incubo a una temperatura de 42 °C durante 48 horas

Cumplido el tiempo de incubación se procedió a sembrar una asada de esta última suspensión en una placa de Agar Mac Conkey e incubo a una temperatura de 30 °C durante 72 horas

Salmonella

Terminando el periodo de incubación se transfirió 0,1 mL de Caldo Digerido de Caseina y Soya a 10 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis para enriquecimiento de Salmonella.

Se incubo a una temperatura de 30 °C durante 24 horas

Cumplido el tiempo de incubación se procedió a sembrar una asada de esta última suspensión en una placa de Agar Xilosa Lisina Desoxicolato e incubo a una temperatura de 30 °C durante 48 horas

Pseudomona

Terminando el periodo de incubación se transfirió 0.1 mL en Agar Cetrimida

Se incubo a una temperatura de 30 °C durante 72 horas

Staphylococcus

Terminando el periodo de incubación se transfirió 0,1 mL en Agar Manitol Salado.

Se incubo a una temperatura de 30 °C durante 72 horas

Tinción Gram:

- Con el Asa de Kolle estéril se colocó una gota agua destilada en el centro de un portaobjetos.
- Con el asa se tomó una pequeña muestra de cepa a analizar y se colocó la muestra sobre la gota de agua del portaobjetos.
- Se hizo un frotis, se secó y fijo al calor flameando la muestra (No directamente) en el mechero, cuidando de no quemar la muestra.
- Se procedió a teñir el frotis durante 1 minuto con cristal violeta.
- se lavó con agua destilada hasta eliminar el colorante.
- Se añadió la solución de yodo (Lugol) y dejo reposar durante un minuto.
- Luego lavamos con agua destilada.
- Posteriormente decoloramos con una mezcla de alcohol acetona hasta que la preparación perdió color.
- Se volvió a lavar con agua destilada.
- Finalmente procedemos hacer la coloración de contraste con safranina durante un minuto.
- Lavamos con agua destilada.
- Secamos y observamos al microscopio.

3.4.9 Determinación del proceso de biodegradación del petróleo utilizando como indicador a la planta *Triticum aestivum* “Trigo”

Para el presente trabajo de investigación, se realizaron tres procedimientos para el proceso de determinación de la biodegradación del petróleo, el primero un diseño en bloques completamente al azar con un arreglo factorial 2A 3B; el segundo un análisis de varianza (ANOVA) con post Hoc Tukey, y por último análisis de regresión lineal simple.

El análisis fue procesado cada seis días, donde se determinó hidrocarburos totales en el suelo, humedad, pH, recuento de microorganismos presentes en los maceteros, temperatura y altura.

Los maceteros fueron expuestos a la intemperie durante 180 días concluido el periodo de bioensayo se evaluara el peso de la planta *Triticum aestivum*. Con respecto a la degradación de hidrocarburos en la tierra contaminada.

3.4.9.1 Distribución del diseño experimental (DBCA)

Para el presente trabajo de investigación, se usó el diseño en bloques completamente al azar con 2 bloques 3 tratamientos y 6 repeticiones (6 maceteros), utilizando maceteros con capacidad de 1,5 kg.

La dosificación por macetero fue 150 g. de aserrín, 150 g. de estiércol y 700 g. de suelo contaminado / suelo no contaminado, para lo cual se utilizó estiércol de gallina blanca de la cepa leghorn, aserrín de roble los cuales se distribuyeron en 36 unidades.

3.4.9.2 Dosificaciones de tratamientos.

De acuerdo a la dosificación de los tratamientos en el diseño en bloque completamente al Azar, se procedió a preparar las muestras respectivas en los maceteros de capacidad 1500 g.

Tabla 6. Dosificación de tratamientos de suelos contaminados y sin contaminar

Bloque	Tratamiento	Combinaciones
1 SSC	T1	SE
	T2	SE + EG
	T3	SE + EG + AS
2 SC	T1	SE
	T2	SE + EG
	T3	SE + EG + AS

(SSC): Suelo sin contaminar

(SC): Suelo contaminado

(SE): Semilla de trigo

(EG): Estiércol de gallina blanca de la cepa leghorn

(AS): Aserrín de roble

3.4.9.3 Instalación del experimento

Para la instalación del experimento se procedió a la dosificación de los 2 bloques con los 3 tratamientos. Tal como se muestra en la tabla 07.

Tabla 7. Combinaciones de tratamientos en el suelo contaminado y suelo sin contaminar.

Bloques	Tratamiento	Combinaciones	Repeticiones
1 SSC	T1	SE	6
	T2	SE + EG	6
	T3	SE + EG + AS	6
2 SC	T1	SE	6
	T2	SE + EG	6
	T3	SE + EG + AS	6
Total			36 unidades experimentales

(SSC): Suelo sin contaminar

(SC): Suelo contaminado

(SE): Semilla de trigo

(EG): Estiércol de gallina blanca de la cepa leghorn

(AS): Aserrín de roble.

Como planta indicadora se utilizó el *Triticum aestivum* “Trigo” en los respectivos maceteros se procedió a realizar la prueba de poder germinativo al 100%, dando un resultado 95% de poder germinativo en placas petri, colocando sobre un papel humectante entre 8 a 10 semillas de Trigo, tal como se aprecia en la figura 3.



Figura 4. Prueba de viabilidad de la semilla de *Triticum aestivum* “Trigo”.

Luego se sembró en los maceteros a una profundidad de 4 cm de profundidad. Con los tratamientos a razón de 10 semillas por macetero. Obteniéndose un 95% de poder germinativo, quedando instalado el experimento, lo cual podemos apreciar en la figura 4.



Figura 5. Instalación del experimento con los tratamientos mencionados en la tabla 6.

Durante el periodo que duro el experimento, para la germinación y crecimiento del trigo se rego con agua destilada, manteniendo su capacidad de campo hasta el término del experimento, para lo cual se controló el riego cada dos días.

3.4.9.4 Medición de las variables de la planta de *Triticum estivum* “Trigo”

Cada 6 días se procedió a medir la altura de la planta desde la base del tallo hasta el ápice de la hoja más larga, el pH, la Temperatura, Humedad relativa y el Recuento Microbiano por macetero.

Así mismo se determinó los hidrocarburos presentes en los suelos contaminados, al culminar el experimento se procedió a pesar la planta de cada uno de los tratamientos, mediante una balanza analítica.



Figura 6. Crecimiento de la planta de *Triticum aestivum* “Trigo” en (A) se muestra el crecimiento a los 30 días y en (B) a los 60 días, bajo condiciones naturales.

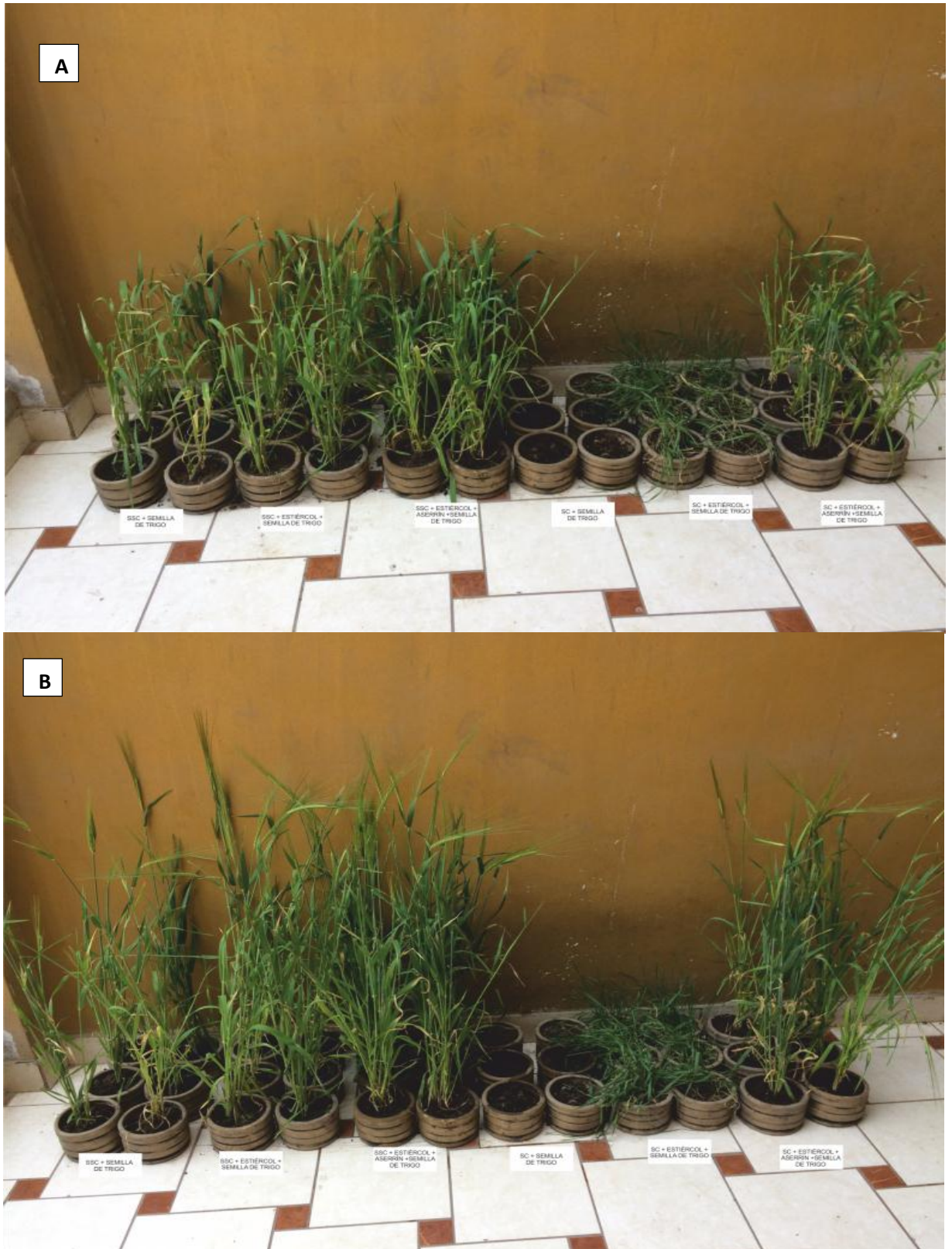


Figura 7. Crecimiento de la planta de *Triticum aestivum* “Trigo” en (A) se muestra el crecimiento a los 120 días y en (B) a los 180 días, bajo condiciones naturales.

IV. RESULTADOS

4.1 Análisis del ensayo de la prueba de esterilidad

De acuerdo a las pruebas de esterilidad. Los resultados del análisis en el Laboratorio de Microbiología de Laboratorios MEDICAL CONCEPT S.A.C. se presentan en la siguiente Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de la prueba de esterilidad de la tierra.

Muestra	Resultado	
Muestra 1	Conforme	Estéril
Muestra 1	Conforme	Estéril
Muestra 2	Conforme	Estéril
Muestra 2	Conforme	Estéril

De los resultados del análisis del ensayo de la prueba de esterilidad en el laboratorio se aprecia que las dos muestras no presentan crecimiento bacteriano durante los 14 días que duro el ensayo dando como resultado conforme, que las muestras analizadas son estériles.

4.2 Análisis de la caracterización fisicoquímica del suelo

Tabla 9. Análisis de la caracterización fisicoquímica del suelo realizado en la universidad Agraria La Molina.

Propiedades	Unidades	Valores	Interpretación
pH 1:1	-	6.87	Neutro
C.E 1:1	dS/m	1.97	Muy ligeramente salino
CaCO ₃	%	1.30	-
M.O.	%	3.59	Medio
P	ppm	113.1	Alto
K	ppm	519	Alto
Clase Textural	-	Franco Arcilloso	-
CIC Total	-	14.40	-
Ca ⁺²	meq/100g	10.92	Alto
Mg ⁺²	meq/100g	1.75	Alto
K ⁺¹	meq/100g	1.52	Alto
Na ⁺¹	meq/100g	0.21	Alto

De acuerdo a la tabla 9. Se aprecia que el suelo tiene una buena fertilidad y buenas características físicas y químicas y una alta concentración de micro elementos (Ca, Mg, K, Na) necesarios para el crecimiento de la planta *Triticum aestivum* “Trigo”. Véase Anexo 2

4.3 Análisis inicial y Final de la concentración de hidrocarburos en la tierra contaminada.

Resultados de la concentración inicial y final de hidrocarburos en el suelo contaminado determinados en el laboratorio ENVIROLAB por Cromatografía de gases según el método EPA 8015 C

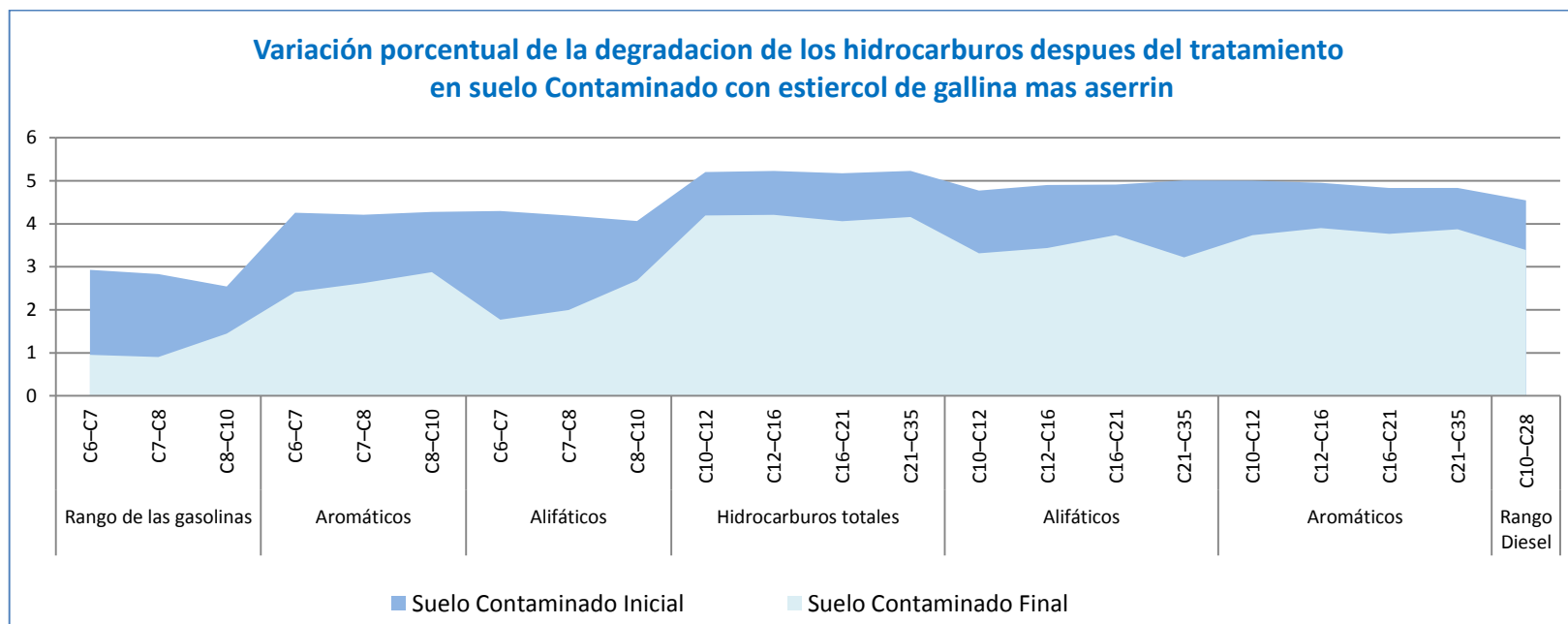
Tabla 10. Resultados de la concentración inicial de hidrocarburos en el suelo contaminado.

Ensayo de Suelo		Rango mg / Kg	Resultado Inicial mg / Kg	Resultado Final mg / Kg	
Hidrocarburos (C6 – C10)	Rango de las gasolinas	C6 – C7	0.030 - 6.0	849	9
		C7 – C8	0.030 - 6.0	678	8
		C8 – C10	0.20 - 36	349	28
	Aromáticos	C6 – C7	0.01 - 100	18059	259
		C7 – C8	0.01 - 100	16209	419
		C8 – C10	0.06 - 600	18849	751
	Alifáticos	C6 – C7	0.01 - 100	19815	59
		C7 – C8	0.01 - 100	15499	99
		C8 – C10	0.06 - 600	11583	483
Hidrocarburos (C10 – C35)	Hidrocarburos totales	C10 – C12	50 - 20000	159288	15588
		C12 – C16	50 - 20000	169094	16124
		C16 – C21	50 - 20000	149297	11464
		C21 – C35	50 - 20000	169493	14381
	Alifáticos	C10 – C12	50 - 20000	59058	2058
		C12 – C16	50 - 20000	79635	2735
		C16 – C21	50 - 20000	81457	5457
		C21 – C35	50 - 20000	101458	1658
	Aromáticos	C10 – C12	50 - 20000	100230	5430
		C12 – C16	50 - 20000	89459	7945
		C16 – C21	50 - 20000	67840	5832
		C21 – C35	50 - 20000	68035	7451
Hidrocarburos (C10 – C28)	Rango diésel	C10 – C28	50 - 20000	35000	2450

De los resultados del análisis inicial del laboratorio ENVIROLAB, se aprecia que los valores de hidrocarburos presentes en la muestra superan el rango mínimo que podría haber en el suelo para poder dejar germinar al Trigo y hacer crecer a la planta sin el proceso de biorremediación. Véase Anexo 3

Los resultados mostrados en la tabla 10 corresponden al análisis inicial y final del tratamiento B3 (estiércol de la gallina blanca de la cepa leghorn mas aserrín de roble) donde se aprecia que los hidrocarburos de petróleo presentes en el suelo contaminado reducen considerablemente tal como se aprecia en el siguiente gráfico.

Gráfico 3. Variación porcentual de la degradación de los hidrocarburos después del tratamiento

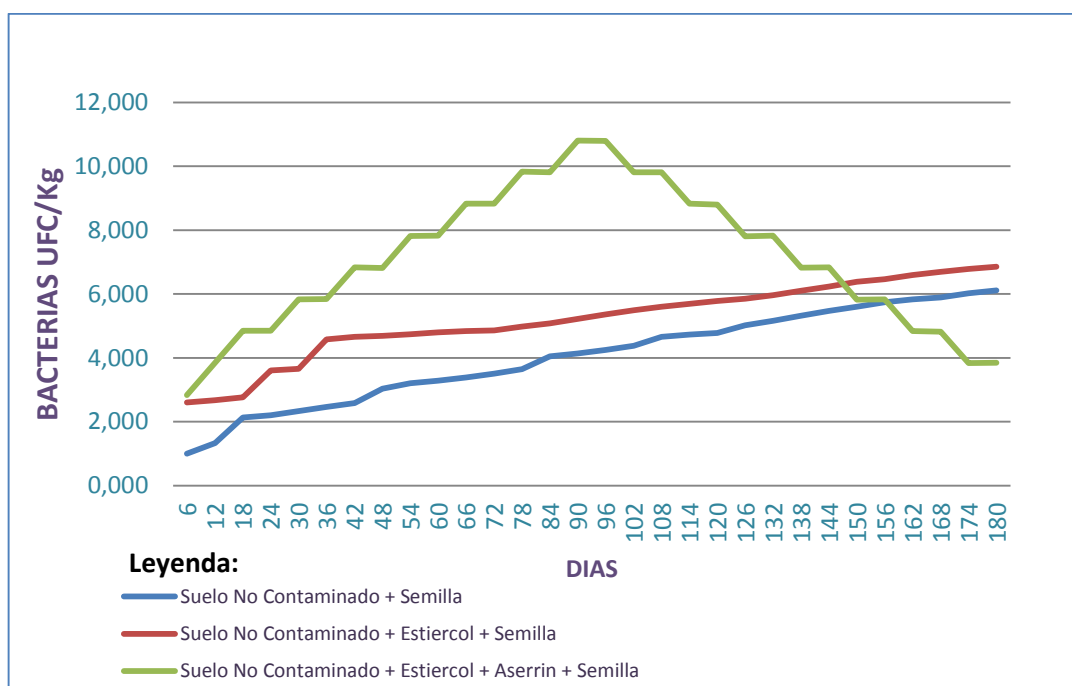


4.4 Análisis del recuento de microorganismos presentes en el suelo contaminado.

A la variable de recuento microbiológico se le extrae su logaritmo para comodidad en el manejo de datos y su representación gráfica

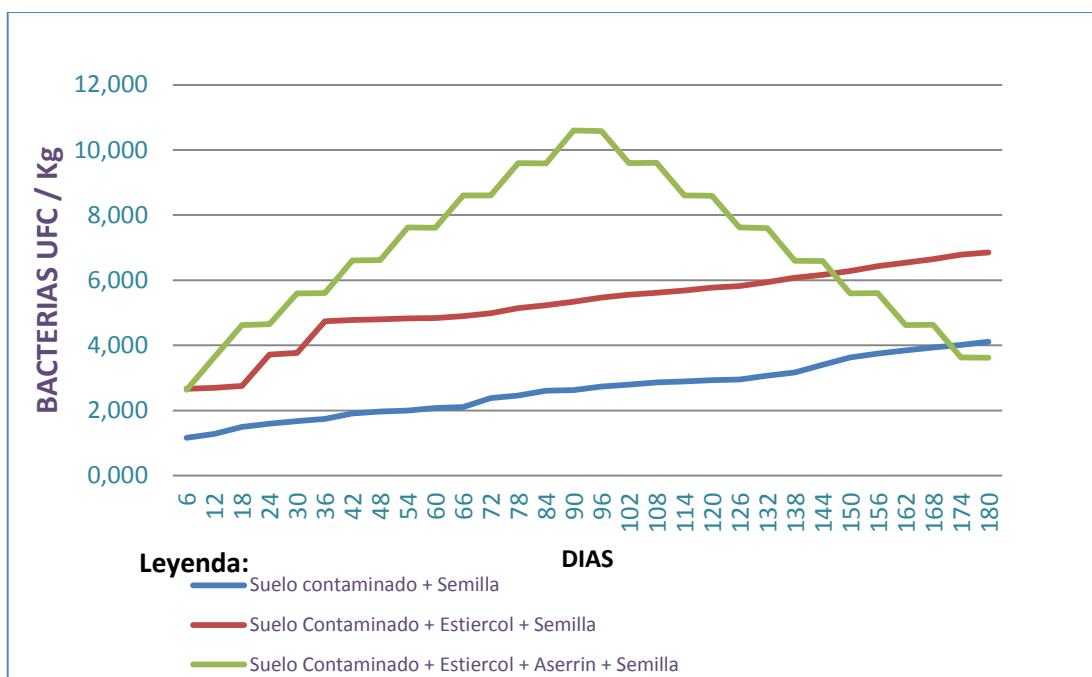
El crecimiento microbiológico que se aprecia en mayor cantidad es en el suelo donde se adiciono el estiércol de la gallina de la cepa leghorn en los tratamientos posteriores hay un crecimiento inusual de microorganismos tal como se muestra en los siguientes gráficos posiblemente por la contaminación cruzada ya que para estos ensayos se utilizó tierra estéril.

Gráfico 4. Recuento microbiano en el suelo no contaminado.



En el gráfico se observa el conteo de microorganismos en suelo no contaminado con hidrocarburos de petróleo que se realizó cada seis días desde el inicio hasta la culminación del experimento observamos también que en el tratamiento B3 los microorganismos presentes en el suelo presentan una fase estacionaria entre los 84 y 120 días posteriormente pasan a una fase de muerte microbiana hasta la culminación del experimento.

Gráfico 5. Recuento microbiano en el suelo contaminado.



En el gráfico se observa el conteo de microorganismos en suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo que se realizó cada seis días desde el inicio hasta la culminación del experimento observamos también que en el tratamiento B3 los microorganismos presentes en el suelo presentan una fase estacionaria entre los 84 y 120 días posteriormente pasan a una fase muerte microbiana hasta la culminación del experimento.

4.5 Análisis de microorganismos específicos en el suelo contaminado y suelo no contaminado.

Microorganismo	Resultado	Tinción Gram
<i>Escherichia coli</i>	Negativo	---
<i>Salmonella</i>	Negativo	---
<i>Pseudomona</i>	Positivo	Bacilo Gram Negativo
<i>Staphylococcus</i>	Positivo	---

4.6 Análisis de las variables

Elaboración de medidas y gráficos descriptivos.

Tabla 11. Estadística descriptiva en suelo contaminado y suelo no contaminado por tratamiento acorde al peso.

Peso Promedio de la Planta <i>Triticum aestivum</i> “Trigo” Por Tratamiento						
Suelo	a1: Contaminado			a2: No Contaminado		
Tratamiento	b1 : Semilla de Trigo	b2 : Estiércol + Semilla de Trigo	b3 : Estiércol + Aserrín + Semilla de Trigo	b1 : Semilla de Trigo	b2 : Estiércol + Semilla de Trigo	b3 : Estiércol + Aserrín + Semilla de Trigo
Macetero 1	40.70	54.60	84.70	0.00	21.10	42.80
Macetero 2	40.80	54.80	84.50	0.00	20.40	41.70
Macetero 3	42.10	52.40	80.70	0.00	20.70	40.20
Macetero 4	43.00	55.90	84.60	0.00	19.80	42.90
Macetero 5	42.50	50.70	85.40	0.00	21.70	40.80
Macetero 6	41.80	53.40	86.90	0.00	21.70	40.80
Promedio	41.82	53.63	84.47	0.00	20.80	41.50
STD Media	0.92	1.88	2.05	0.00	0.66	1.16
Error	0.38	0.77	0.84	0.00	0.27	0.47

En la tabla 11. Se muestra el peso promedio de la planta *Triticum aestivum* “Trigo” de cada macetero de los 180 días que duro el experimento con respecto al tratamiento se observa también que el peso es mayor en el tratamiento B3 independientemente del suelo contaminado y suelo sin contaminar con hidrocarburos de petróleo.

Tabla 12. Estadística descriptiva en suelo no contaminado por tratamiento acorde a la Temperatura.

Temperatura Promedio de cada Macetero Por Tratamiento						
Suelo	a1: Contaminado			a2: No Contaminado		
Tratamiento	b1 : Semilla de Trigo	b2 : Estiércol + Semilla de Trigo	b3 : Estiércol + Aserrín + Semilla de Trigo	b1 : Semilla de Trigo	b2 : Estiércol + Semilla de Trigo	b3 : Estiércol + Aserrín + Semilla de Trigo
Macetero 1	28.62	29.72	32.86	0.06	11.78	27.89
Macetero 2	28.53	29.65	32.84	0.00	10.70	27.96
Macetero 3	28.48	29.62	32.85	0.00	10.86	27.95
Macetero 4	28.51	29.56	32.89	0.00	10.87	27.95
Macetero 5	28.51	29.90	32.85	0.00	10.86	27.95
Macetero 6	28.54	29.71	32.85	0.00	11.04	27.94
Promedio	28.53	29.69	32.86	0.01	11.02	27.94
STD Media	0.05	0.12	0.02	0.02	0.39	0.03
Error	0.02	0.05	0.01	0.01	0.16	0.01

En la tabla 12. Se muestra la temperatura de cada macetero de los 180 días que duro el experimento con respecto al tratamiento se observa también que la temperatura en el tratamiento B3 independientemente del suelo contaminado y suelo sin contaminar con hidrocarburos de petróleo están en un rango optimo que permite la proliferación de microorganismos.

Tabla 13. Intervalo de las variables independientes.

Tipo de suelo	pH	Humedad %	Temperatura °C	Bacterias UFC	Altura cm	Peso g
No contaminado	6.6- 7.6	57.17 - 64	28.36 - 33.15	10 – 6385 x 10 ⁷	0 - 106.675	0 – 41.50
Contaminado	6.5-7.9	57.17 - 64	27.89-32.997	14.5 – 3996 x 10 ⁷	0 - 104.558	0 – 84.47

En la tabla 13 se observa los intervalos de las variables independientes del experimento.

4.6.1 Diseño en bloques completamente al Azar (DBCA)

Se realizó un experimento con un arreglo factorial 2A (Tipos de suelo) 3B (Tratamientos) en DBCA en 6 campos de cultivo (maceteros), para evaluar el efecto de **la biodegradación de petróleo en el suelo contaminado**. Empleando la altitud de la planta *Triticum aestivum* “Trigo” como punto de referencia de los tres Tratamientos (Tratamiento b1, b2 y b3). Los resultados obtenidos (en cm) se presentan a continuación.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + e_{ijk} \quad i = 1, \dots, p \quad j = 1, \dots, q \quad k = 1, \dots, r_{ij}$$

Y_{ijk} Es la altitud en cm obtenida de la planta *Triticum aestivum* “Trigo” con el i-ésimo Tipo de suelo, j-ésimo Tratamiento, K-ésimo campo de cultivo.

μ Es el efecto de la media general

α_i Es el efecto del i-ésimo Tipo de suelo.

β_j Es el efecto del j-ésimo Tratamiento acorde al tipo de suelo

$(\alpha\beta)_{ij}$ Es el efecto de la interacción en el i-ésimo Tipo de suelo, j-ésimo tratamiento.

e_{ijk} Es error experimental i-ésimo Tipo de suelo, j-ésimo Tratamiento, k-ésimo Campo de cultivo.

p 2 es el número de niveles del factor A.

q 3 es el número de niveles del factor B.

b 6 es el número de bloques

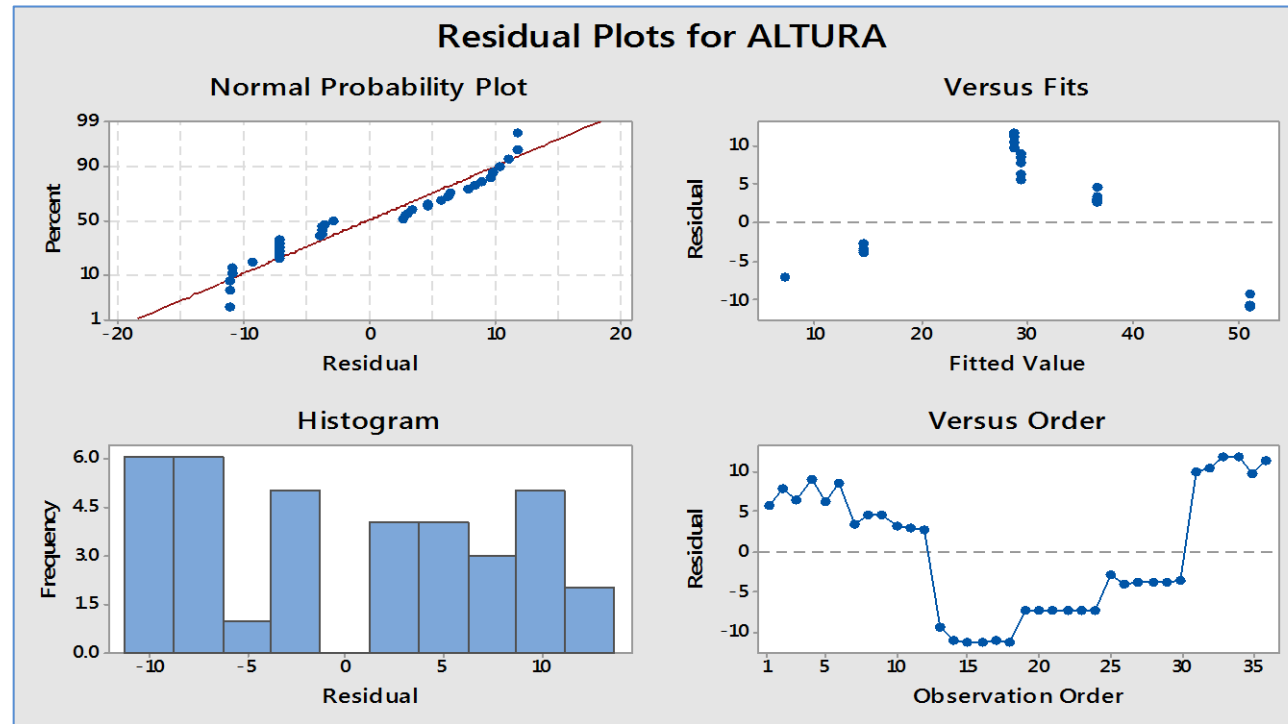
Tabla 14. Altitud promedio obtenida en cada tratamiento por macetero (cm) durante los 180 días que duro el experimento.

Altura Promedio de la Planta <i>Triticum aestivum</i> “Trigo” Por Tratamiento						
Suelo	a1: Contaminado			a2: No Contaminado		
Tratamiento	b1 : Semilla de Trigo	b2 : Estiércol + Semilla de Trigo	b3 : Estiércol + Aserrín + Semilla de Trigo	b1 : Semilla de Trigo	b2 : Estiércol + Semilla de Trigo	b3 : Estiércol + Aserrín + Semilla de Trigo
Macetero 1	35.01	40.11	41.68	0.06	11.78	38.68
Macetero 2	37.16	41.26	40.04	0.00	10.70	39.30
Macetero 3	35.71	41.25	39.91	0.00	10.86	40.65
Macetero 4	38.33	39.81	39.91	0.00	10.87	40.65
Macetero 5	35.55	39.57	40.10	0.00	10.86	38.60
Macetero 6	37.77	39.35	39.88	0.00	11.04	40.06
Promedio	36.59	40.22	40.25	0.01	11.02	39.66
STD Media	1.35	0.84	0.70	0.02	0.39	0.93
Error	0.55	0.34	0.29	0.01	0.16	0.38

En la tabla 14. Se muestra la altura promedio de la planta *Triticum aestivum* “Trigo” de cada macetero de los 180 días que duro el experimento con respecto al tratamiento se observa también que la altura es mayor en el tratamiento B3 independientemente del suelo contaminado y suelo sin contaminar con hidrocarburos de petróleo.

4.6.2 Prueba de Homocedasticidad y Normalidad

Grafico 6. Prueba de Homocedasticidad y normalidad



Según el gráfico 6, los datos tienen distribución normal, error normal y que los datos están por encima de la recta de regresión, tiende a cumplir el supuesto de Homocedasticidad ($p=0,0418$) y cumple también el supuesto de Normalidad ($p=0,455$) por lo tanto procedemos con el diseño experimental.

4.6.3 Análisis de Variancia.

Tabla 15. Análisis de variancia de la altura (cm) por macetero durante los 180 días que duro el experimento.

CUADRO ANOVA						
Fuentes de Variación	Grados de Libertad (GL)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados Medios ()	Fc	p-value	Nivel de Significancia
Repeticiones	5	2.3	0.5			n.s
A Suelos	1	4406.5	4406.5	6173.2291	0.00	***
B Tratamientos	2	2912.2	1456.1	2039.8605	0.00	***
AB Suelo :Tratamiento	2	2167.6	1083.8	1612	0.00	***
Residuales	25	17.8	0.7			
Total	35	9506.3				

En la tabla 15 se observa un nivel de significación del 5% se rechaza la hipótesis planteada Ho. En conclusión, hay suficiente evidencia estadística para aceptar que existe interacción entre el tipo de suelo y los tratamientos. Por lo tanto, será necesario efectuar un análisis de los efectos simples de los factores factor A (Tipos de Suelos) vs Factor B (Tratamiento).

El coeficiente de variación para este experimento es:

$$cv = \frac{\sqrt{CM Res}}{\hat{\mu}} = \frac{\sqrt{0.7}}{27.96} = 2.99\%$$

En experimentos agrícolas se considera un coeficiente aceptable si $cv \leq 25\%$

4.6.4 Análisis de Efectos Simples

Este análisis se efectúa, debido a que la interacción suelo vs altura resultó significativa y consiste en evaluar cada factor en cada uno de los tratamientos.

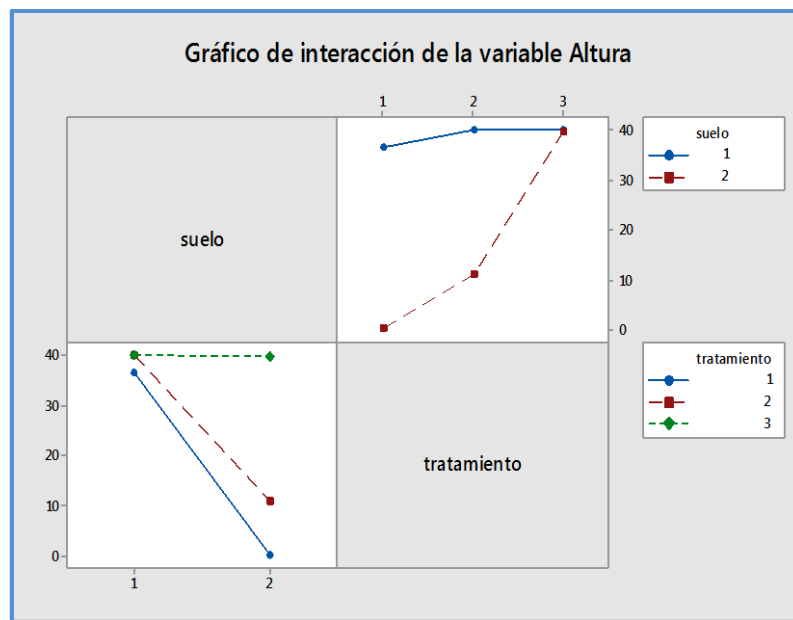
Tabla 16. Análisis de efectos simples.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad (GL)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados Medios (CM)	Fc	Nivel de Significancia
AB1	1	4013.923408	4013.923408	5623.221217	**
AB2	1	2559.088133	2559.088133	3585.100468	**
AB3	1	1.068033	1.0680333	1.496239	n.s
BA1	2	53.316744	26.6583722	37.346483	**
BA2	2	5026.391433	2513.195717	3520.808456	**
Residuos	25	17.845303	0.7138121		
Total	32	11671.63305			

En la tabla 16 se observa el efecto simple de A (Suelos) en B1 (Tratamiento semilla de *Triticum aestivum*) y B2 (Tratamiento estiércol de gallina más semilla de *Triticum aestivum*) resulto significativo. En comparación a B3 (Tratamiento estiércol de gallina más semilla de *Triticum aestivum* mas aserrín de roble) no resulto significativo, no mostró una mejora en el crecimiento ya que ambos suelos contaminados y sin contaminar presentan alturas similares.

Según el gráfico de interacción que a continuación mostramos podemos evidenciar que el tratamiento B3 no resultó significativo con respecto al tipo de suelo.

Gráfico 7. Interacción de la variable altura



En el gráfico 7 de significación del 5% existe suficiente evidencia estadística para aceptar que al menos uno de los tratamientos realizados se obtienen resultados diferentes en el crecimiento de la planta *Triticum aestivum* “Trigo” los dos tipos de suelo producen resultados diferentes en el crecimiento de trigo cuando se aplican las dosis B1 y B2, es decir con las semilla de *Triticum aestivum* “Trigo” y Estiércol de la gallina más la semilla de *Triticum aestivum* “Trigo” respectivamente.

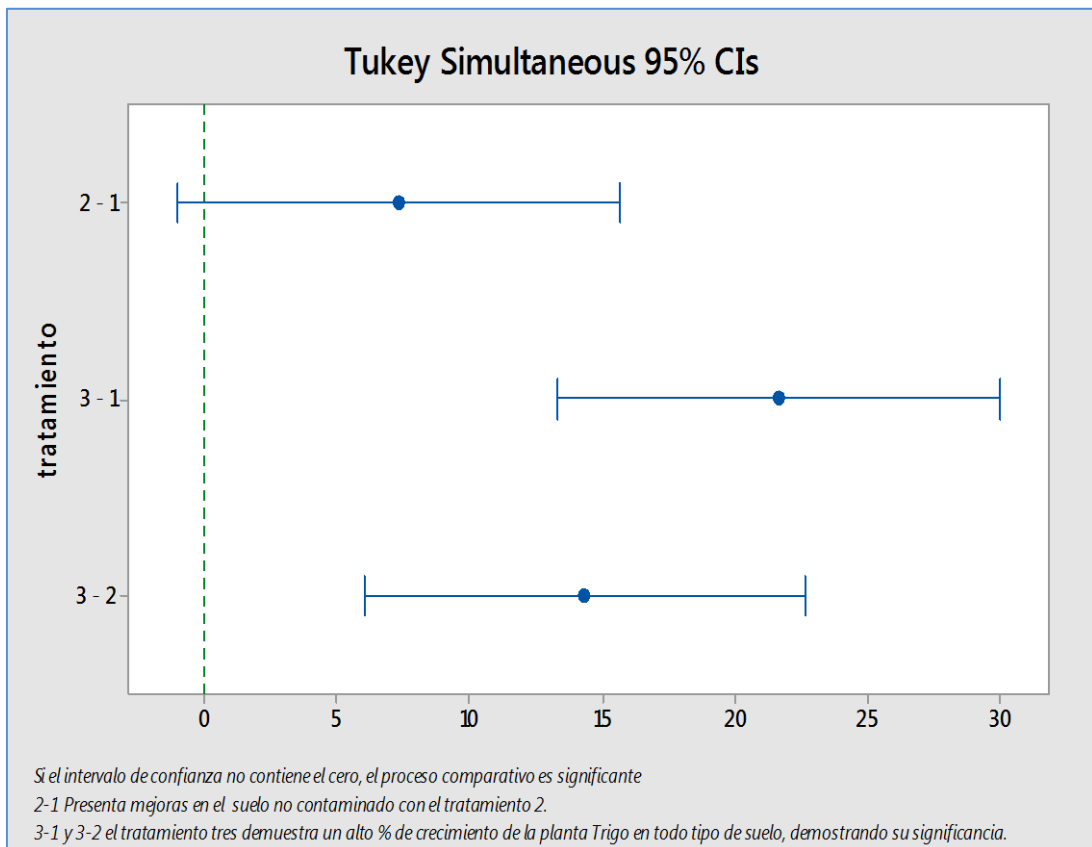
A un nivel de significación del 5%, no existe suficiente evidencia estadística para aceptar que los dos tipos de suelos producen resultados diferentes en el crecimiento del *Triticum aestivum* “Trigo” cuando se aplica el tratamiento B3 Estiércol de gallina más aserrín de roble más semilla de *Triticum aestivum* “Trigo”.

Las conclusiones post hoc en este experimento serían las siguientes:

Estableciendo las comparaciones de medias de los tratamientos del DBCA, las pruebas de Tukey HSD dieron como resultado diferencias significativas ($p < 0,05$) quedando demostrado que el tratamiento B3 Estiércol de gallina más aserrín de roble más semilla de Trigo promueve la degradación del hidrocarburos; dado que el crecimiento ha llegado a su punto máximo, señalando la efectividad de este como agente responsable de la biodegradación de los hidrocarburos presentes en el petróleo.

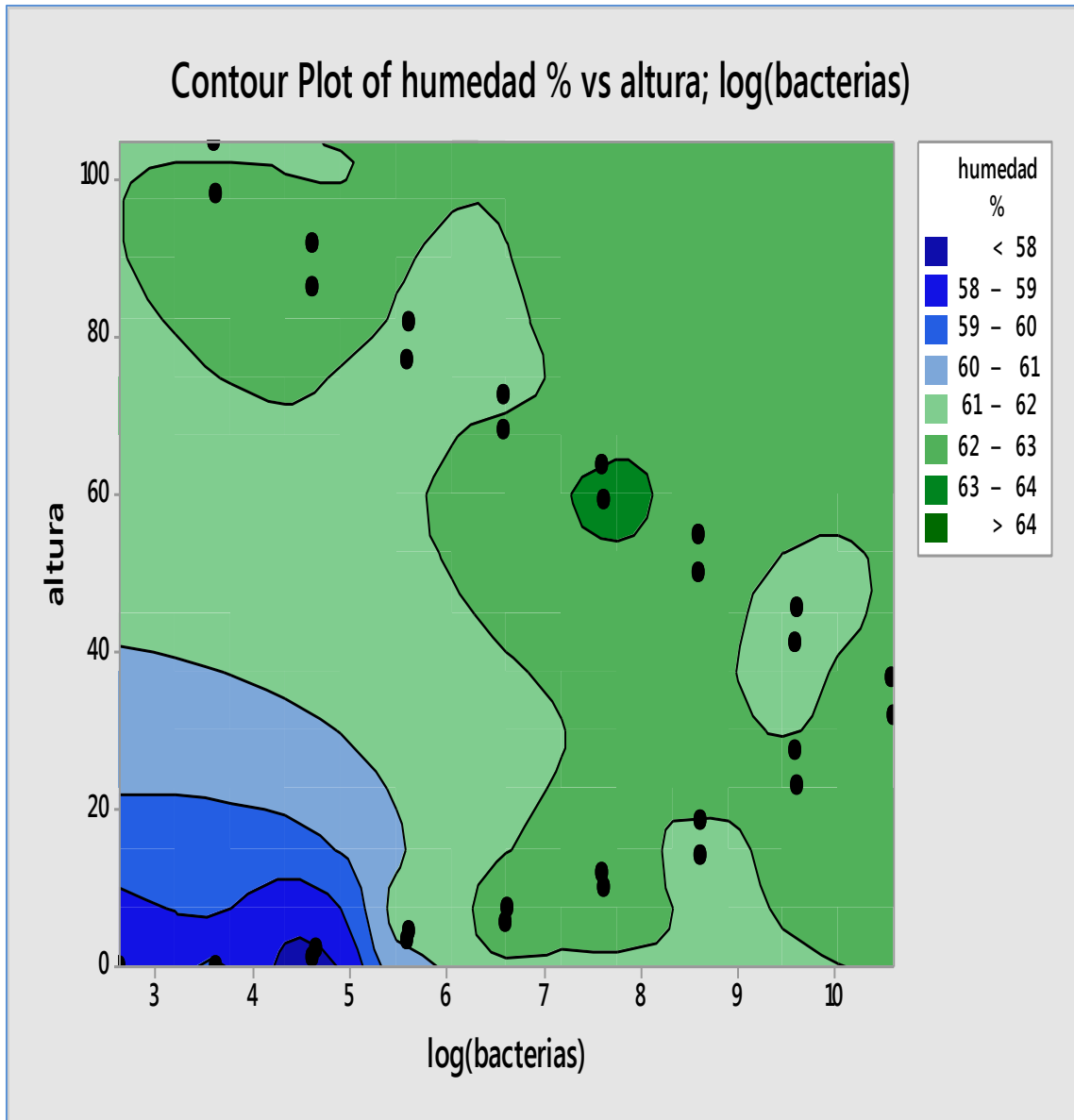
El tratamiento B1 y B2 no registraron diferencias significativas

Gráfico 8. Tukey – Comparativo de tratamientos en un DBCA



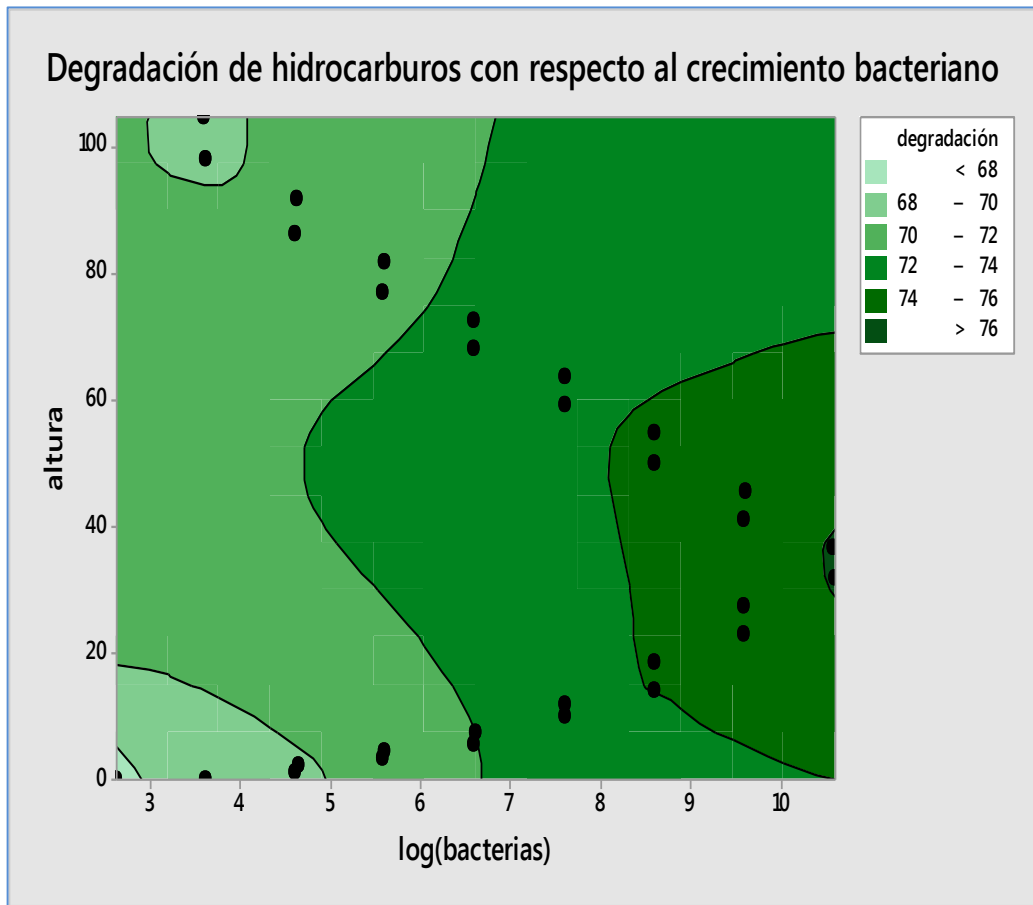
4.6.5 Análisis de la relación de las variables con respecto a la altura de la planta *Triticum aestivum* “Trigo”.

Gráfico 9. Gráfico de contorno de la relación de la humedad vs la altura de la planta *Triticum aestivum* y el log (Bacterias)



En el gráfico 9 se observa que la humedad relativa entre 61 – 64 % favorece un crecimiento bacteriano y como consecuencia la altura de la planta *Triticum aestivum* “Trigo” mejora considerablemente.

Gráfico 10. Gráfico de contorno de la relación de la degradación de hidrocarburos vs la altura y el log (Bacterias)

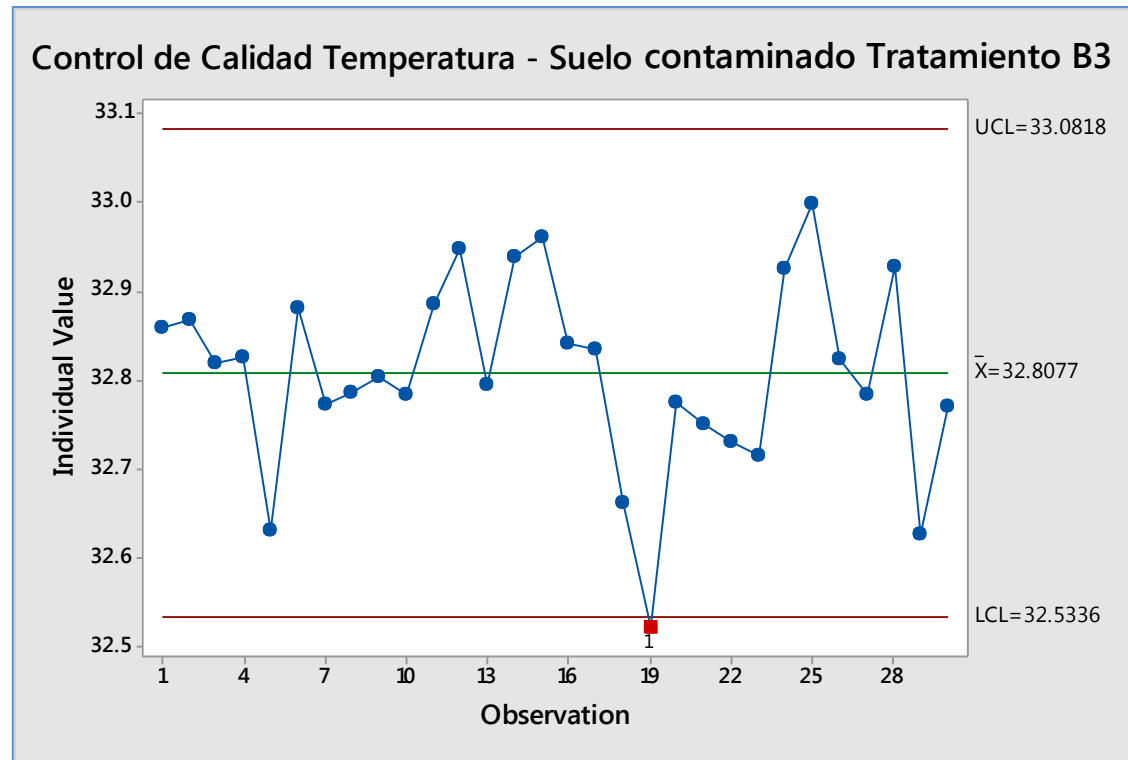


En el gráfico 10 se observa muestra de la degradación de los hidrocarburos de petróleo está en relación a la concentración de microorganismos presentes en el suelo es decir a mayor recuento microbiológico mayor será la degradación de hidrocarburos y como consecuencia la altura de la planta *Triticum aestivum* "Trigo" mejora considerablemente.

El crecimiento bacteriano esta en relación directa con la Temperatura es por ello que se realizó el control de calidad a la temperatura para evaluar que esta tiene relación y favorece el crecimiento de las bacterias.

Temperatura ideal para un crecimiento microbiológico $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

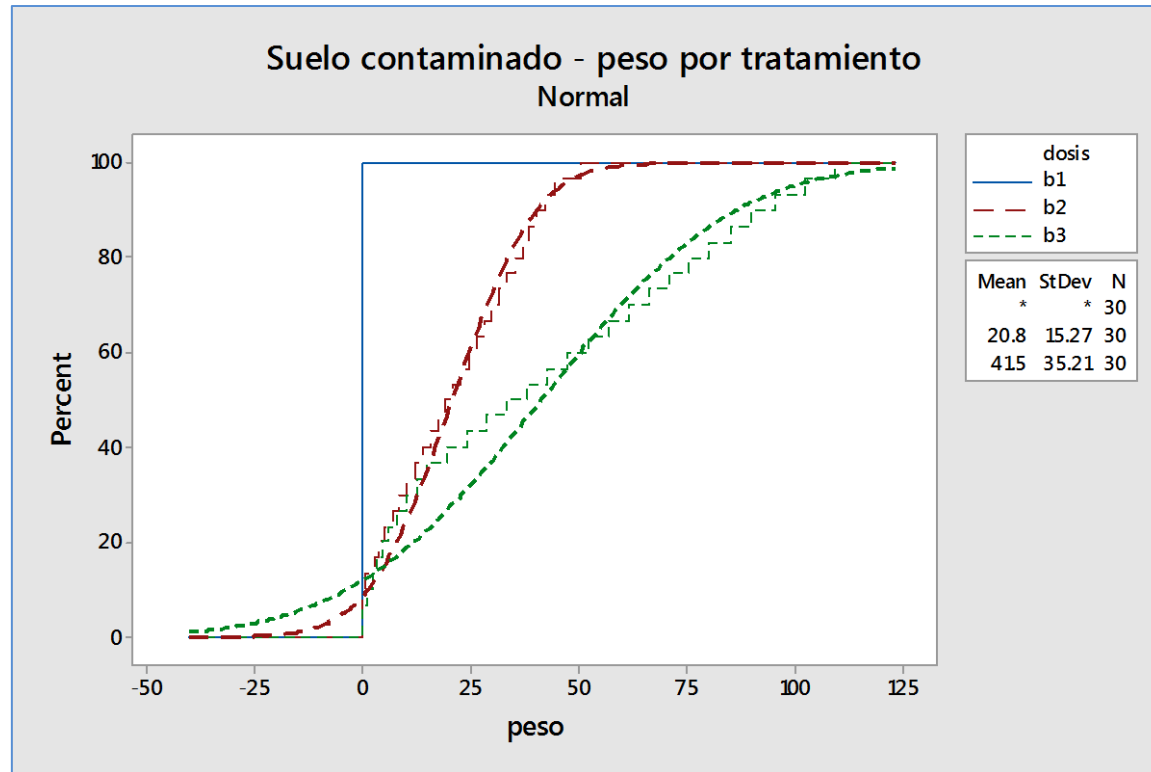
Gráfico 11. Control de Calidad de la temperatura en el suelo Contaminado con respecto al tratamiento B3.



En el gráfico 11 se observa el control de calidad de la temperatura en el suelo contaminado podemos evidenciar que la temperatura es ideal para el crecimiento Microbiológico asegurando que habrá una mayor proliferación microbiana y por ende habrá mayor degradación de hidrocarburos de petróleo.

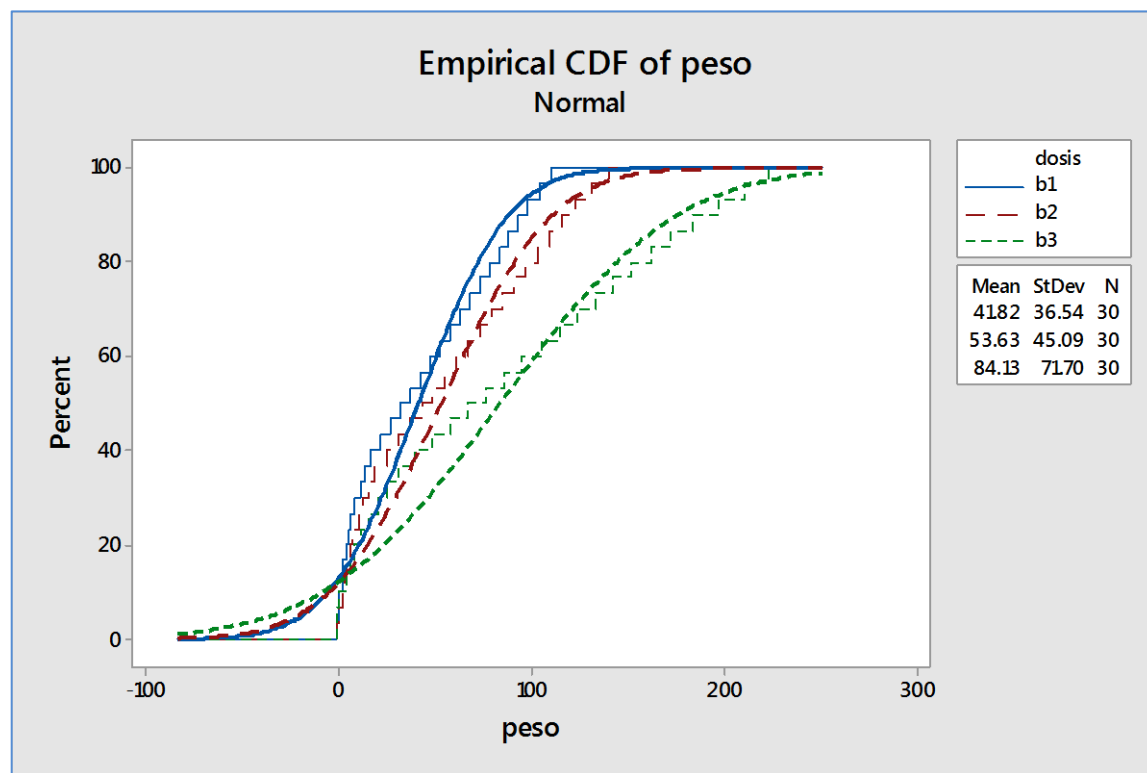
4.6.6 Análisis del peso con relación a los tratamientos.

Gráfico 12. Cinética del peso y crecimiento de la planta *Triticum aestivum* “Trigo” en el suelo contaminado con relación al tratamiento.



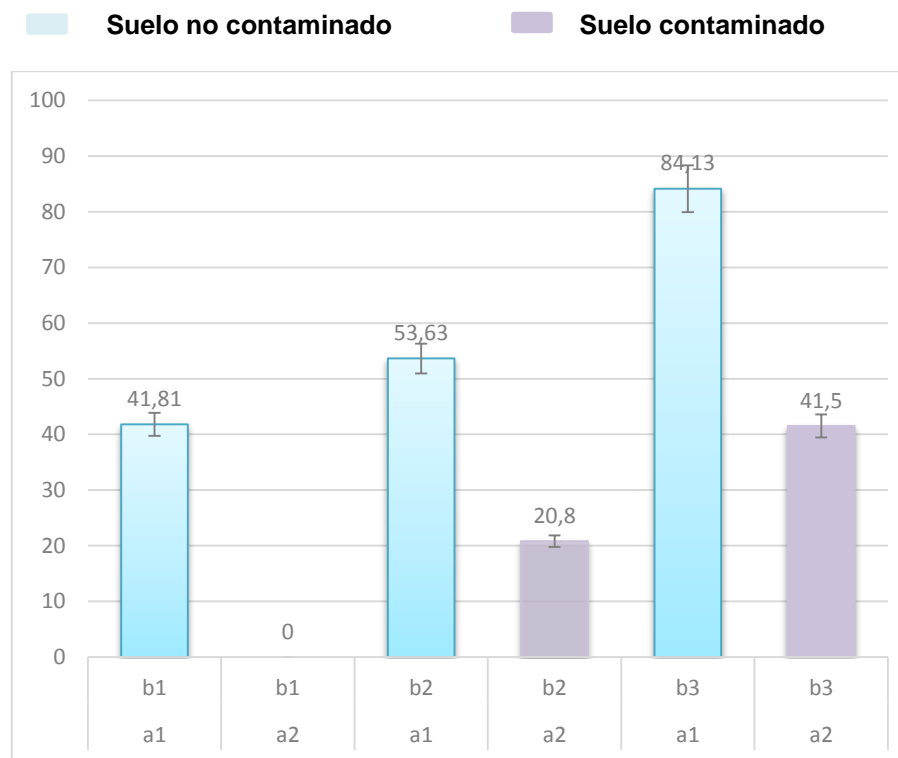
En el gráfico 12 se observa que el tratamiento B3 en el suelo contaminado es mejor en comparación a los dos tratamientos B1 y B2.

Gráfico 13. Cinética del peso y crecimiento de la planta *Triticum aestivum* “Trigo” en el suelo no contaminado con relación al tratamiento.



En el gráfico 13 se observa que el tratamiento B3 en el suelo no contaminado es ligeramente mejor en comparación a los dos tratamientos B1 y B2.

Gráfico 14. Efecto microbiológico sobre el peso de la planta *Triticum aestivum* “Trigo” con respecto al tipo de suelo Contaminado y sin contaminar.

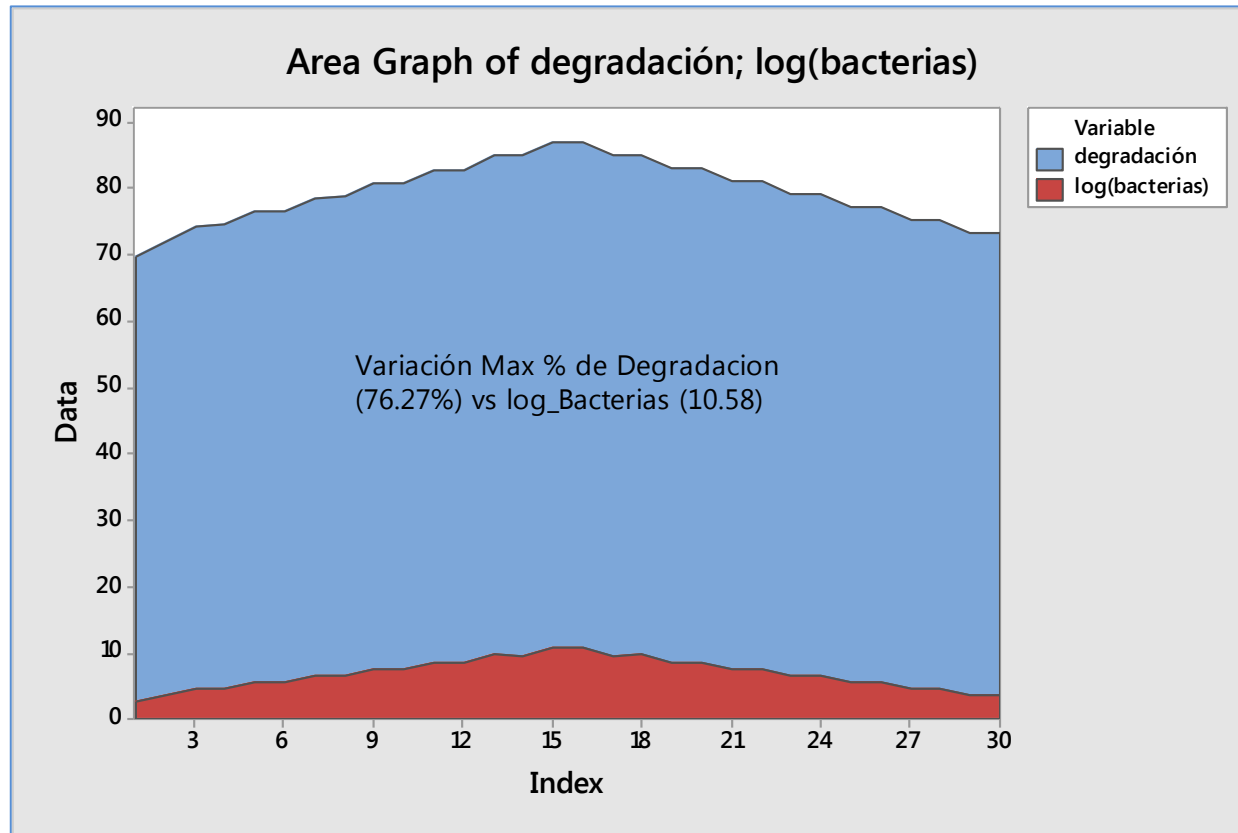


En el gráfico 14 se puede evidenciar que el tratamiento B3 en el suelo contaminado y suelo sin contaminar es mejor en comparación a los dos tratamientos B1 y B2 con respecto al peso pero difieren en el tipo de suelo.

El peso es mayor en el suelo no contaminado en comparación al suelo contaminado.

4.6.7 Análisis final de la degradación de hidrocarburos en el suelo contaminado con el tratamiento B3.

Gráfico 15. Gráfico de contorno de la degradación de hidrocarburos versus el logaritmo de las bacterias.



En el gráfico 15 se observa que la máxima degradación de hidrocarburos por parte de los microorganismos presentes en el estiércol de la gallina fue de 76,27%.

V. DISCUSIONES

El suelo no contaminado en este experimento tiene buenas características físicas y químicas y una alta concentración de microelementos (Ca, Mg, K, Na) que permiten el crecimiento, floración y fructificación de las plantas. así mismo presenta una alta concentración de materia orgánica producto de los residuos de las plantas o excreciones de animales según Martínez *et al* 2015. es importante tener una alta concentración de microelementos y materia orgánica que permitirá el desarrollo crecimiento y fructificación de las plantas.²³

En este experimento se evaluó la temperatura óptima ideal para el crecimiento bacteriano, ya que la temperatura es un factor importante que influye en la biodegradación de hidrocarburos de petróleo. A respecto Escalante 2010. Considera importante la temperatura optima ya que asegura el crecimiento microbiológico y también tiene un efecto directo sobre la naturaleza física y la composición de los constituyentes de los hidrocarburos de petróleo, cuando las temperaturas son bajas los hidrocarburos tienden a ser más viscosos y su solubilidad en agua reducen en gran medida, una temperatura baja también afectara al crecimiento bacteriano y su propagación; bajo estas circunstancias la degradación de hidrocarburos disminuirán en consecuencia.²²

Durante el experimento se observó que las hojas de la planta *Triticum aestivum* "Trigo" cultivadas en el suelo contaminado presentaron coloración amarilla. Chaîneau *et al.* 2014. Reporto quemaduras, deficiencias fisiológicas y clorosis (coloración amarilla en las hojas) que crecieron en suelos contaminados por hidrocarburos, atribuyendo a la concentración de hidrocarburos en el suelo mas no por la deficiencia de magnesio.²⁴

El pH durante el experimento estuvo dentro de los valores óptimos para la degradación de los hidrocarburos de petróleo 6,5 – 8,5 según Avendaño. 2014, algunos microorganismos pueden sobrevivir en un amplio rango de pH, pero otros son sensibles a pequeñas variaciones. Las bacterias crecen mejor en valores de pH casi neutros mejorando el proceso de biodegradación en general.⁴¹

Los hidrocarburos que en mayor porcentaje se degradaron fueron los hidrocarburos C6 – C10 lo cual coincide con U.S. EPA 2015 que reporto que los compuestos de hidrocarburos con bajo peso molecular son relativamente fáciles de biodegradar, los hidrocarburos ramificados se degradan lentamente en comparación a los hidrocarburos de cadena lineal, generalmente cuando aumenta el tamaño de la molécula el proceso de biodegradación es más lento.³⁸

Se evidencio que la reducción de los hidrocarburos de petróleo fue mejor con el tratamiento B3 (Aserrín de roble, Estiércol de gallina y Semilla de trigo) en comparación a los demás tratamientos B1 (Semilla de Trigo) y B2 (Semilla de Trigo y Estiércol de gallina). Lo cual coincide Buendía 2012 que reporto que el crecimiento del maíz mejoro considerablemente con la combinación de estiércol de vacaza, cerdaza y aserrín.⁹

Con respecto a la altura de la planta *Triticum aestivum* “Trigo” el tratamiento B3 no tuvo significancia alguna en los dos tipos de suelo (contaminado y sin contaminar) sin embargo en el peso difieren, el peso de la planta en suelo no contaminado es mayor que el peso de la planta en suelo contaminado esto se debe a que los hidrocarburos presentes en el suelo alteran el crecimiento normal de la planta, lo cual coincide Buendía 2012 que reporto el peso de la planta del maíz se ve afectado por la concentración de hidrocarburos.⁹

VI. CONCLUSIONES

- Se determinó que las pseudomonas son las bacterias responsables de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo.
- Se aisló las colonias bacterianas presentes en el estiércol de las gallinas blancas de la cepa leghorn que pertenecen a la familia pseudomonadaceae.
- Los suelos contaminados tratados con estiércol de la gallina blanca de la cepa leghorn, semilla de *Triticum aestivum* y aserrín tuvieron un promedio 41.5 g de peso, en comparación a los tratamientos de suelos contaminados usando solamente estiércol y semilla de *Triticum aestivum* un promedio de 20.8 g y utilizando solo semilla de *Triticum aestivum* no hubo crecimiento.
- Se demostró el proceso de biodegradación de hidrocarburos de petróleo, se alcanzó tasas de remoción de 91,1 % de hidrocarburos totales donde el mejor tratamiento fue el B3 que contenía la semilla de *Triticum aestivum* “Trigo”, aserrín de roble y estiércol de la gallina blanca de la cepa leghorn.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda el uso de estiércoles orgánicos, más aserrín como fuente de remediación para suelos contaminados por hidrocarburos de petróleo.
2. Se recomienda el uso de estiércol de gallina y aserrines porque es una tecnología de bajo costo y fácil manejo, para recuperar la calidad del suelo contaminado por hidrocarburo de petróleo.
3. Aplicar esta técnica de biorremediación a los suelos contaminados por parte de las refinerías para la recuperación de suelos.
4. Realizar una prueba piloto en una hectárea de terreno con suelos contaminados por hidrocarburos de petróleo usando plantas tolerantes y reductoras de hidrocarburos.
5. Se recomienda mejorar la actividad microbiana para optimizar y reducir el tiempo de degradación de hidrocarburos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rosales L. Biorremediación de suelos contaminados con aceite usado de automóvil con el hongo de la pudrición blanca *Pleorutus ostreatus* (setas) [Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias y gestión ambiental]. Durango, México: Instituto Politécnico Nacional – Gestión Ambiental; 2008 [citado el 02 de Agosto del 2016]. Disponible en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/12726/biorremediacion.pdf?sequence=1>
2. Clancy C, Kerremans S. La dependencia petrolera y la amazonia peruana. *Revista del instituto Chaikuni* [en línea], V. 01, p. 001 – 005, abril 2015. [Citado el 04 de Agosto de 2016]; Disponible en: <http://chaikuni.org/chaikuni/wp-content/themes/chaikuni/downloads/dependencia-petrolera.pdf>
3. Rosenberg E, Legmann R, Kushmano A, Taube R. Biorremediación de petróleo – un problema de múltiples fases. *Artículos de biodegradación* [en línea], V. 03, p. 337, agosto de 1992. [Citado el 04 de Agosto de 2016]; Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00129092>
4. Pucci G, Acuña A, Pucci O. Biodegradación de hidrocarburos en fondos de tanques de la industria petrolera. *Revista Peruana de Biología*, [en línea], V. 22, n. 1, p. 097 – 101, abril 2015. ISSN 1727-9933 [Citado el 04 de Agosto de 2016]; Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/11126>
5. Balderas I, Sanchez J. “Biorremediación de suelo contaminado con 75000 ppm de aceite residual automotriz (ARA) por bioestimulación y fitorremediación con *sorghum vulgare* y *Bacillus cereus* y/o *Burkholderia cepacia*” *J. Selva Andina Res. Soc.* [en línea] 2015 [citado el 05 de septiembre del 2016]; 6 (1): 23-32. Disponible en:

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_isoref&pid=S2072-92942015000100004&lng=es

6. Sanchez J, Alonso J, Dasgupta N, Marquez L. “Biorremediación con *Sorghum bicolor* inoculado con *Burkholderia cepacia* y *Penicillium chrysogenum*” J. Selva Andina Res. Soc. [en línea] Noviembre 2015 [citado el 05 de septiembre del 2016]; 3 (2): 86-94. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5295200>

7. Silvana C, Martínez M, Arocena L. Estudio comparativo del agregado de enmiendas orgánicas e inorgánicas en procesos de biorremediación de suelos norpatagónicos contaminados con petróleo Rev. Sociedad Química del Perú [en línea] Octubre 2014 [citado el 06 de Septiembre del 2016]; 80 (4): 251-261. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2014000400004&script=sci_abstract.

8. Ferreira T, Santos F, Pessoa de Franca F. “Biorremediación de un suelo tropical contaminado con residuos aceitosos intemperizados” Rev. Int. Contaminación Ambiental [en línea] 2013 [citado el 06 de Septiembre del 2016]; 29 (1): 21-28. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000100002.

9. Buendía H. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol. Rev. del Instituto de Investigación (RIIGEO), FIGMMG-UNMSM [en línea] Julio - Diciembre 2012 [citado: 17/07/2013]; Vol. 15, N. ° 30, pp. 123. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/viewFile/4101/3268>.

10. Llenque L. Aislamiento e identificación de bacterias heterótrofas de suelos contaminados con petróleo provenientes de oleocentros de la ciudad de Trujillo, Perú. Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú; 2011 [citado julio- diciembre]; 31(2): disponible en:
http://www.facbio.unitru.edu.pe/index.php?option=com_content&view=article&id=76&Itemid=181
11. Torres K, Zuluaga T. Biorremediación de suelos contaminados por Hidrocarburos [Tesis para obtener el grado de ingeniera química]. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia – Facultad de Minas; 2009 [citado el 02 de Septiembre del 2015]. Disponible en:
http://www.bdigital.unal.edu.co/815/1/32242005_2009.pdf
12. Rossini F. Hydrocarbons in Petroleum, Journal of chemistry [Internet]. 2013 [Citado 15 de agosto de 2016]; 37(11):554-561. Disponible en:
<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ed037p554>
13. Casellas M, Fernandez P, Bayona J, Solanas M. “Bioassay – directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona” National Library of Medicine [en línea] 2005 [citado el 06 de septiembre del 2016]; 30 (4): 725-740. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7889349>
14. Speight J. The chemistry and technology of petroleum [Internet]. 2011 [Citado 18 de agosto del 2015]; 2(44):114. Disponible en:
<http://197.14.51.10:81/pmb/CHIMIE/Fundamentals%20of%20Petroleum%20and%20Petrochemical%20Engineering.pdf>
15. Bocángel C. Evaluación de la eficacia de un consorcio bacteriano aislado en la base peruana “Machu Picchu” – Antártida en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, a nivel de terrarios. [Tesis para obtener el grado de doctorado en microbiología]. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Ciencias

Biológicas Escuela Académica de parasitología y microbiología; 2016 [citado el 02 de Septiembre del 2016]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/4804>

16. Verma S, Bhargava R, Pruthi V. Oily sludge degradation by bacteria from ankleshwar india international biodeterioration y biodegradation [Internet]. 2006 [Citado 18 de agosto del 2015]; 57(4):207-213 Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/222028127_Oily_Sludge_Degradation_by_Bacteria_From_Ankleshwar
17. Zhou L, Jiang X, Liu J. Características de la combustión de lodos aceitosos en lechos fluidizados circulantes [Internet]. 2009 [Citado 18 de agosto del 2015]; 170(1):175-179. Disponible en: http://www.researchgate.net/publication/26253347_Characteristics_of_oil_sludge_combustion_in_circulating_fluidized_beds
18. Ze Bilo'o, Ngassoum M. Treatment of conditioned oily sludge from Cameroon petroleum refinery by centrifugation. International journal of environmental sciences [Internet]. 2013 [Citado 15 de agosto de 2015]; 3 (5):1373-1382. Disponible en: <http://www.ipublishing.co.in/ijesarticles/thirteen/articles/volthree/EIJES31138.pdf>
19. Van H, Singh A, Ward OP. Recent advances in petroleum microbiology. National Library of Medicine [Internet]. 2003 [Citado 18 de agosto de 2015]; 67 (4):503-49. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665675>
20. Morgan P, Watkinson R. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos . Rev. Biotechnol. España. Madrid 1989 p. 305-330
21. Frick C, Farrell E. Assessment of Phytoremediation as an in situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites. Petroleum Technology Alliance of Canada. Vancouver, British Columbia. 2014 p. 105-120.

22. Escalante E. Estudio de ecotoxicidad de un suelo contaminado con hidrocarburos. [Tesis para obtener el maestro en biotecnología]. México, DF: Universidad Autónoma Metropolitana – División de ciencias básicas e Ingeniería; 2000 [citado el 05 de Septiembre del 2016].
23. Martínez E, López F. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas del suelo arcilloso. *Terra latinoamerica*, vol. 19, núm. 1, enero-marzo, 2001, p. 9-17 Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, México.
24. Chaineau C, Morel J. Land Traedment of oil based drill cutting in an agricultural soil. *Journal of Enviromental Quality*. España. Madrid 2014 p. 858-867
25. Piskonen R, Itavaara M. Evaluation of chemical pretreatment of contaminated for imporved PAH bioremediation applied Microbiology and biotechnology. National Library of Medicine [Internet]. 2004 [Citado 18 de agosto de 2015]; 65 (5):627-634. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15293029>
26. Leahy J, Colwell R. Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment National Library of Medicine [Internet]. 1990 [Citado 10 de diciembre de 2015]; 54 (3):305-315. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372779/>
27. Liu J, Jiang X, Zhou L, Han X, Cui Z. Pyrolysis treatment of oil sludge and model – free kinetics analysis. *Journal of hazardous materials* [Internet]. 2009 [Citado 10 de Diciembre de 2015]; 161 (3):1208-1215. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389408006237>

28. MacNaughton S, Stephen J, Venosa A, Davis G, Chang Y, White D. Microbial population changes during Biorremediation of an Experimental oil spill National Library of Medicine [Internet]. 1999 [Citado 12 de enero del 2016]; 68 (8):3566-3574. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91535/>
29. Loser C, Seidel H, Stottmeister U. Microbial degradation of hydrocarbons in soil during aerobic/ anaerobic Applied microbiology and Biotechnology [Internet]. 1998 [Citado 10 de Diciembre de 2015]; 49 (5):631-636. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002530051225>
30. Mishra S, Jyot J, Kuhad R, Lal B, Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily sludge contaminated soil applied and environmental microbiology, Revista Sociedad Americana de microbiología. Nueva Delhi. India; 2001 [Citado 18 de Diciembre de 2015]; 67 (4):1675 – 1681. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/67/4/1675.short>
31. Johnson C, Scow K. Microbial degradation of Hydrocarbons in the Environment Experimental oil spill National Library of Medicine [Internet]. 1990 [Citado 12 de enero del 2016]; 68 (8):305-315. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372779/pdf/microrev00038-0103.pdf>
32. Guerrero J. El Compost un abono orgánico compuesto para mejorar y dar vida a nuestros suelos. Taller de conservación de suelos y agricultura sostenible. UNALM. Lima.2001 p. 15
33. Cando M. Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos [Tesis para obtener el grado de ingeniero ambiental]. Cuenca, Ecuador: Universidad Politécnica – Facultad de Ingeniería Ambiental; 2011 [citado el 05 de Septiembre del 2015]. Disponible en:

<http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1520/11/UPS-CT002143.pdf>

34. Arbaiza J. Centro Internacional de Tecnología y Transformación de la Madera. CITE. Ucayali Perú 2011. P. 65
35. Juscamayta J. Biorremediación de suelos contaminados mediante el uso de organismos vivos. [Tesis para obtener el grado de ingeniería química]. Lima, Perú: Universidad Politécnica – Facultad de Ingeniería Ambiental; 2011 [citado el 05 de Septiembre del 2015]. Disponible en: http://www.bdigital.unal.edu.co/815/1/32242005_2009.pdf
36. Ocampo J, Robles D. El compostaje como método de Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis para obtener el grado de ingeniero ambiental UNALM. Lima. 2014, p. 81 – 82.
37. Farmacopea de los Estados Unidos USP 39 NF 34 CAPITULO <71> Examen microbiológico de productos estériles: Prueba de esterilidad. Estados Unidos. 2016, p. 139 – 143.
38. Método 8015C. Agencia de Protección Ambiental de los estados unidos. [Internet]. Estados Unidos: 2015. [Citado 15 agosto de 2016]. 33 p. Disponible en: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8015d_r4.pdf
39. Farmacopea de los estados unidos USP 39 NF 34 CAPITULO <61> Examen microbiológico de productos no estériles: Prueba de recuento microbiano. Estados Unidos. 2016, p. 115 – 122.
40. Farmacopea de los estados unidos USP 39 NF 34 CAPITULO <62> Examen microbiológico de productos no estériles: Prueba de recuento microbiano Test de microorganismos específicos. Estados Unidos. 2016, p. 122 – 130.

41. Avendaño D. el proceso de compostaje [Tesis para obtener el grado de ingeniero agrónomo con mención a fructificación y enología]. Chile, Pontificia Universidad Católica de Chile – Facultad de agronomía e Ingeniería Forestal Santiago de Chile; 2003 [citado el 05 de Septiembre del 2015].

IX. GLOSARIO

ANOVA. Técnica fundamental que en su diseño más sencillo desarrolla un contraste de hipótesis estadísticas.

HOMOCEDEASTICIDAD. En estadística se dice que un modelo predictivo presenta homocedasticidad cuando la varianza del error condicional a las variables explicativas es constante a lo largo de las observaciones.

X. ANEXOS

Anexo 1

Prueba de Tukey

```
> tHSD <- TukeyHSD(anva3)
> print(tHSD)
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level
$`suelo:tratamiento`

              diff          lwr          upr          p adj
a2:b1-a1:b1 -36.57833333 -38.081592 -35.0750747 0.0000000
a1:b2-a1:b1  3.63666667  2.133408  5.1399253 0.0000012
a2:b2-a1:b1 -25.57000000 -27.073259 -24.0667414 0.0000000
a1:b3-a1:b1  3.66500000  2.161741  5.1682586 0.0000010
a2:b3-a1:b1  3.06833333  1.565075  4.5715920 0.0000190
a1:b2-a2:b1  40.21500000  38.711741  41.7182586 0.0000000
a2:b2-a2:b1  11.00833333  9.505075  12.5115920 0.0000000
a1:b3-a2:b1  40.24333333  38.740075  41.7465920 0.0000000
a2:b3-a2:b1  39.64666667  38.143408  41.1499253 0.0000000
a2:b2-a1:b2 -29.20666667 -30.709925 -27.7034080 0.0000000
a1:b3-a1:b2  0.02833333 -1.474925  1.5315920 0.9999999
a2:b3-a1:b2 -0.56833333 -2.071592  0.9349253 0.8488256
a1:b3-a2:b2  29.23500000  27.731741  30.7382586 0.0000000
a2:b3-a2:b2  28.63833333  27.135075  30.1415920 0.0000000
a2:b3-a1:b3 -0.59666667 -2.099925  0.9065920 0.8215093
```