



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL**

“INFLUENCIA DE *ENTEROBACTER CLOACAE* EN LA DEGRADACIÓN DE  
PETRÓLEO PRESENTE EN SUELOS DE NEGRITOS – PIURA, 2018”

**TESIS PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO (A) AMBIENTAL**

**AUTORES**

ALFARO SUÁREZ, Yaritza Lizet

(0000-0002-6354-7586)

PEREZ ROSADO, Boyer Wagner

(0000-0003-0448-8376)

SANCHEZ GAMBOA, Alexi Anabel

(0000-0001-5972-4677)

**ASESOR:**

Ing. Villacorta Gonzalez, Misael Ydilbrando

(0000-0002-5346-4824)

**LÍNEA DE**

**INVESTIGACIÓN:**

**CONSERVACIÓN Y MANEJO DE LA BIODIVERSIDAD**

**TRUJILLO – PERÚ**

**2018**

## **DEDICATORIA**

A Dios por la salud y darme las fuerzas de lograr hasta donde estoy hoy, en segundo lugar, a mis padres de no haber sido por sus constantes esfuerzos no hubiese logrado terminar esta importante meta.

**Alfaro Suárez, Yaritza**

Dedico a mis padres por el apoyo incondicional durante mi formación: a mi madre Doris, que siempre me apoyaba y daba buenos consejos en seguir y culminar una meta trazada, a mi papá con la solvencia económica, también agradezco a todas las personas que me ayudaron a cumplir este objetivo.

**Pérez Rosado, Boyer**

Esta investigación la dedico a mis hermanos Jhon, Yordi y Maythe; por mostrarme su belleza interna; ellos son mi fuente de motivación para culminar esta etapa académica que Dios les de sabiduría e inteligencia.

**Sanchez Gamboa, Alexi.**

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, agradecer a Dios por habernos permitido culminar nuestros estudios universitarios de manera satisfactoria, regalándonos la vida, salud y fortaleza.

A la Universidad Cesar Vallejo por ser nuestra alma mater, en especial a la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental y a los docentes por habernos por enseñarnos sus conocimientos y experiencias.

A nuestros padres por su grande amor y sacrificio para darnos educación, no nos alcanzan las palabras para decirles lo mucho que los amamos por todo lo que hicieron por nosotros, por sus palabras tan sinceras y pasibles en tiempos de dificultad, por su apoyo moral e incondicional durante la etapa académica, a nuestros abuelitos y hermanos por ser nuestra fuente de inspiración para lograr las metas, son las personas más valiosas que tenemos en la vida.

A nuestros asesores que desinteresadamente nos apoyaban en la elaboración de este proyecto al ingeniero Félix Rivero y a todas las personas que fueron participes de este proyecto.

**PAGINA DEL JURADO**

---

Dr. Medardo Alberto Quezada Álvarez

**PRESIDENTE**

---

Ing. Misael Ydilbrando Villacorta

**SECRETARIO**

---

Ing. Walter Moreno Eustaquio

**VOCAL**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Nosotros; **Alfaro Suárez Yaritza Lizet**, identificada con DNI N° 75509307, **Pérez Rosado Boyer Wagner**, identificado con DNI N° 70120041, **Sanchez Gamboa Alexi Anabel**, identificada con DNI N° 61599008, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Ambiental, declaramos bajo juramento que toda la documentación que acompaño a esta es verás y auténtica.

Así mismo, declaramos también bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en la presente tesis son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de la información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, 18 de Diciembre del 2018.

---

Alfaro Suárez Yaritza Lizet  
DNI N° 75509307

---

Perez Rosado Boyer Wagner  
DNI N° 70120041

---

Sanchez Gamboa Alexi Anabel  
DNI N° 61599008

## PRESENTACIÓN

Estimados Miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presentamos ante ustedes la Tesis titulada: **“Influencia de *Enterobacter cloacae* en la degradación de petróleo presente en suelos de Negritos – Piura, 2018”**, con la finalidad de degradar el porcentaje de petróleo en suelos contaminados con este componente la cual contempla seis capítulos:

Capítulo I: Introducción, donde se relatan las bases teóricas y la descripción de la realidad problemática, además su posible solución tomando en cuenta la justificación del estudio, hipótesis y objetivos.

Capítulo II: Método, describiendo el diseño de investigación, métodos de muestreo, diseño, variables, población y muestra, así como las técnicas e instrumentos empleados y los métodos de tratamiento de datos.

Capítulo III: Se basa en la descripción de los resultados de acuerdo a los objetivos considerados.

Capítulo IV: Se considera las discusiones de los resultados obtenidos así también las comparaciones necesarias con trabajos similares.

Capítulo V: Contempla las conclusiones por cada objetivo de la investigación.

Capítulo VI: Las recomendaciones para futuras investigaciones.

La presente investigación ha sido elaborada de acuerdo a la Guía de Productos Observables para Investigaciones de fin de carrera.

## INDICE

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTO .....	ii
PAGINA DEL JURADO.....	iv
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	v
PRESENTACIÓN.....	vi
INDICE.....	vii
RESUMEN .....	ix
ABSTRACT .....	x
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Realidad problemática .....	1
1.2. Trabajos previos.....	2
1.3. Teorías relacionadas al tema.....	5
1.3.1. Normas nacionales.....	5
1.3.2. Generalidades de los hidrocarburos .....	5
1.3.3. Degradación de hidrocarburos en suelo .....	5
1.3.4. Bacteria <i>Enterobacter cloacae</i> .....	6
1.3.5. Efectos del petróleo en el suelo .....	8
1.3.6. Principios básicos del proceso de biorremediación .....	8
1.3.7. Tecnologías físico-químicas para eliminar petróleo del suelo.....	8
1.3.8. Tecnologías ambientales de degradación de petróleo en suelo.....	9
1.3.9. Microorganismos degradadores de hidrocarburos.....	9
1.4. Formulación del problema .....	10
1.5. Justificación del estudio .....	10
1.6. Hipótesis .....	11
1.7. Objetivo .....	11
1.7.1. General .....	11
1.7.2. Específicos .....	11
<b>II. MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>11</b>
2.1. Tipo y diseño de investigación .....	11
2.2. Operacionalización de variables .....	12
2.2.1. Independiente .....	12
2.2.2. Dependiente.....	12
2.3. Población, muestra y muestreo .....	12
2.3.1. Población.....	12

2.3.2.	Muestra .....	12
2.4.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.....	13
2.4.1.	Descripción del procedimiento .....	13
2.5.	Procedimiento .....	14
2.5.1.	Obtención de la muestra.....	14
2.5.2.	Identificación De <i>E. Cloacae</i> .....	14
2.5.3.	Aislamiento de <i>E. cloacae</i> .....	14
2.5.4.	Caracterización de <i>E. cloacae</i> .....	15
2.5.5.	Preparación del suelo.....	16
2.5.6.	Preparación del inóculo.....	17
2.5.7.	Técnica de extracción y gravimetría.....	17
2.5.8.	Filtración y Extracción .....	18
2.6.	Método de análisis de datos .....	19
2.7.	Aspectos éticos .....	20
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
3.1.	Aislamiento e identificación de <i>E. cloacae</i> .....	20
3.2.	Análisis de TPH inicial .....	21
3.3.	Porcentaje de degradación de petróleo de <i>Enterobacter cloacae</i> al término del experimento. ....	21
3.4.	Porcentaje de degradación de petróleo con respecto al tiempo. ....	22
3.5.	Influencia de la concentración de <i>E. cloacae</i> en la degradación de petróleo. .	23
3.6.	Análisis Estadístico.....	24
<b>IV.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>26</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>27</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>28</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>31</b>



## RESUMEN

La presente investigación pretende ser una alternativa de solución a la contaminación del suelo a causa de los derrames de hidrocarburos, con tecnologías que sean amigables con el medio ambiente y que su costo de aplicación sea factible, por ello, se planteó como objetivo evaluar la influencia de las concentraciones de *E. cloacae* en el porcentaje de degradación de petróleo presente en suelos de Negritos – Piura, 2018. La muestra de suelo fue recolectada de pozos abandonados con restos de petróleo crudo, luego fue homogenizada y esterilizada para eliminar microorganismos que pudiesen interferir en la presente investigación. El experimento se llevó a cabo mediante dos tratamientos de *E. cloacae* diferenciados por la concentración: para el tratamiento 1 se inoculó  $14 \times 10^6$  UFC/ml, y para el tratamiento 2 se inoculó  $14 \times 10^{10}$  UFC/ml con 3 repeticiones cada una durante 30 días. Las *E. cloacae* se aislaron en una muestra que contenía Caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI), la selección se realizó en Agar MacConkey para luego ser identificado por las pruebas bioquímicas, los análisis se realizaron cada 10 días mediante el método de Soxhlet, extracción y gravimetría. Los resultados mostraron que el tratamiento 1 degradó el 52.01% (37.58g) de petróleo y el tratamiento 2 degradó el 61.59% (44.51g) de petróleo, por consiguiente, se llegó a concluir que ambas concentraciones degradan significativamente el petróleo de suelos de Negritos.

## PALABRAS CLAVES

Degradación, influencia, Bacteria, suelos, petróleo.

## **ABSTRACT**

The present research intends to be an alternative solution to soil contamination due to oil spills, with technologies that are friendly to the environment and that its application cost is feasible, therefore, the objective was to evaluate the influence of the concentrations of *E. cloacae* in the percentage of oil degradation present in the soils of Negritos - Piura, 2018. The soil sample was collected from abandoned wells with remnants of crude oil, then homogenized and sterilized to eliminate microorganisms that could interfere in the present research. The experiment was carried out by means of two treatments of *E. cloacae* differentiated by concentration: for treatment 1,  $14 \times 10^6$  CFU / ml was inoculated, and for treatment 2,  $14 \times 10^{10}$  CFU / ml was inoculated with 3 repetitions each during 30 days. The *E. cloacae* was isolated in a sample containing Brain-Heart-Infusion Broth (BHI), the selection was made in MacConkey Agar for a later identification by biochemical tests, the analyzes were performed every 10 days by using the Soxhlet method, extraction and gravimetry. The results showed that treatment 1 degraded 52.01% (37.58g) of oil and treatment 2 degraded 61.59% (44.51g) of oil, therefore, it was concluded that both concentrations significantly degrade oil from Negritos soils. .

## **KEYWORDS**

Degradation, influence, bacteria, soils, oil.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Realidad problemática**

La contaminación ambiental en el ámbito internacional, nacional y local forma parte de nuestra vida, la forma como se está degradando los ecosistemas marinos y terrestres genera una gran preocupación.

Además el crecimiento de la población a escala mundial, la industrialización y la gestión inadecuada de los materiales y residuos peligrosos están amenazando al medio ambiente, como consecuencia se genera la acumulación de sustancias tóxicas, siendo una de las alteraciones más severas que impactan negativamente al medio ambiente; la contaminación ambiental por acumulación de petróleo se da en todos los países productores de hidrocarburos y es considerada una de las contaminaciones más severas en los ecosistemas terrestres y acuáticos, amenazando la extinción de especies.

Según el informe del Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería (OSINERGMIN), en nuestro país se ha registrado 190 derrames de petróleo en los últimos 20 años, a pesar de ello, no existe información estadística pública de la ubicación, extensión y el manejo adecuado de productos de la industria del petróleo.

Tal es el caso del distrito Negritos en la provincia de Talara a más de 1.5 km de distancia se encuentran 5 pozos abandonados de petróleo, estos representan un gran riesgo para la salud y medio ambiente estos generan agentes contaminantes que alteran el agua, el aire, el suelo y a la vez, alteran la calidad de vida de las personas.

Los derrames de petróleo en diferentes puntos del país provocan perjuicios directos y colaterales a los recursos naturales, de tal manera que; en el suelo se impide el intercambio gaseoso con la atmósfera, imposibilitando la entrada y salida de luz teniendo a fin el no intercambio gaseoso. Una de las medidas para mitigar el problema es utilizar métodos que sean amigables con el medio ambiente y tener un bajo costo, en la presente investigación se propone utilizar un tratamiento biológico utilizando un microorganismo como *E. cloacae*”, capaces de remediar suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo.

## 1.2. Trabajos previos

IZQUIERDO Andrés. (2013), en su tesis titulada “Biodegradación de HAP’s durante la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de población bacteriana y genes funcionales” cuyo objetivo fue analizar los procesos de microorganismos implicados en la biorremediación de suelos contaminados con concentraciones de petróleo. Los resultados demostraron que el tratamiento de biorremediación disminuyó la concentración inicial de 19 799 mg/kg a una concentración posterior de 6 373 mg/kg equivalente a 67.8% en un periodo de 120 días.

HERNANDEZ Nancy. (2016), En su tesis titulada “Establecimiento de un proceso de biorremediación usando *Stenotrophomonas maltophilia*” el objetivo fue evaluar la efectividad de la biorremediación en muestras de suelo nativo y un suelo modelo usando *Stenotrophomonas maltophilia*, a nivel laboratorio, utilizando la técnica de bioaumentación. Los resultados demostraron que el reactor controló la agitación de *Stenotrophomonas maltophilia* y los porcentajes de remoción fueron de 96.22%, por lo tanto, su uso es factible en la técnica de bioaumentación.

ANZA Héctor. *et al* (2016), En la investigación titulada “Biorremediación de suelos contaminados de aceite automotriz usados, mediante un sistema de biopilas” su objetivo fue construir cuatro biopilas, en tres tratamientos para remediar suelos contaminados con aceites de automotriz. En su estudio obtuvo como resultado que la remoción de hidrocarburos alifáticos fue de 93.7% a 87.1% y en los hidrocarburos aromáticos de 0% a 94.8% en 90 días utilizando bacterias nativas como *Acinetobacter sp*, *Sphingobacterium sp* y *Stenotrophomona sp*.

ARCILLA Luisa. (2015), en su investigación titulada “Análisis comparativo de la eficiencia de productos para la biorremediación de suelos contaminados con diésel utilizando métodos de bioestimulación y bioaumentación a escala piloto.” El objetivo fue evaluar la eficiencia de productos que logren disminuir diésel en suelos contaminados, mediante bacterias, enzimas degradadoras y fertilizante. Como resultado obtuvo que las bacterias disminuyeron el nivel de TPH a 89%, las enzimas degradadoras redujeron 76% con la adición de fertilizante se evidenció que la remoción fue de 90%. Todos sus tratamientos se llevaron a cabo en 98 días.

BUENDIA Hildebrando. (2013), en su tesis titulada “Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, mediante compost de aserrín y estiércol” se planteó, determinar la recuperación de este suelo, usando aserrín y estiércol, empleando como planta indicadora el maíz; obtuvo como resultado más significativo el tratamiento con bagazo más aserrín de bolaina. Puesto que de 21.81 gr de TPH/kg de suelo bajo su concentración a 16.28 gr de TPH/kg, equivalente al 25% de remediación y obtuvo un mayor crecimiento de las plantas de maíz (49.77cm).

PURISACA Davis y QUEVEDO Héctor. (2015), en su tesis “Eficiencia de *Actinobacterias* nativas en la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos en la provincia de Talara, región Piura” se planteó como objetivos, evaluar la eficiencia de la biodegradación de suelos contaminados con petróleo por *Actinobacterias* nativas, sus resultados indicaron que el contenido de hidrocarburos totales de petróleo, fue de 22900 mg/Kg de suelo en el Lote 111 y 21 200 mg/Kg Lote IV; el 82,70% de las muestras del Lote 111 y el 76,93% del Lote IV resultaron positivas para el aislamiento, se obtuvieron 436 aislados en el Lote 111 y 215 en el Lote IV. El 81,05% de las *Actinobacterias* procedentes del Lote 111 utilizaron el petróleo como fuente de carbono y energía, durante 40 - 240 horas.

SAMANEZ Elizabet. (2013), en su investigación “Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo” se planteó como objetivo estimar la capacidad de biodegradación de un consorcio bacteriano, mediante la aplicación de fertilizantes inorgánicos como el nitrógeno, fósforo y potasio (bioestimulación) en suelos contaminados con petróleo crudo durante 90 días, obtuvo como resultados que la bacterias *Aeruginosa* tiene una actividad emulsificante de 4.9 UAE/ml, 3,7 UAE/ml y *Bacillus sp* 3.8 UAE/ml, por otro lado la actividad degradativa es igual para los tres géneros de bacterias.

VIVANCO Luis. (2013), en su investigación “Degradación de petróleo en suelos contaminados con restos de petróleo de la refinera talara, utilizando microorganismos autóctonos y compost” cuyo objetivo fue evaluar la eficiencia de los microorganismos en la degradación con Borra, un consorcio nativo y compost. Este estudio obtuvo como resultados que el tratamiento con compost al suelo contaminado con borra, redujo el

70.16% y 85.41%, la combinación de compost y consorcio autóctono degradó el 34.40% y 42.47%, el consorcio autóctono al suelo contaminado con borra degradó 25.51% y 41.12% de degradación y por último la prueba testigo realizada con el suelo contaminado con borra y agua destilada estéril, cuya degradación de petróleo fue de 6.08 y 10.12%.

YAYA Leslie. (2017), en su tesis, “Biodegradación de TPH (hidrocarburos totales de petróleo) por bacterias nativas sometidas a distintas condiciones de cultivo aplicados en aguas residuales del Callao” cuyo objetivo fue aplicar bacterias en óptimas condiciones para biodegradar TPH en aguas residuales. Los resultados mostraron una disminución de TPH (C5-C10) inicial de 136,1 mg/L a 60,99 mg/L final en términos porcentuales la disminución oscila entre 55.3% y 65.3%, por otro lado las fracciones de Hidrocarburos (C10 – C28) y (C28 – C40) demostraron una disminución de 453 mg/L inicial y de 157,1 mg/L final; esto significa que las bacterias Nativas (*Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Auriginosus*) son eficientes, aun cuando su metabolismo es lento.

RAMIREZ Beder. *et al.* (2016), realizó el estudio de “Eficiencia de cepas bacterianas aisladas del manglar para biorremediar suelos contaminados con petróleo.” Cuyo objetivo fue evaluar la capacidad de degradación de TPH con cepas bacterianas aisladas del manglar, el porcentaje de degradación de hidrocarburos con las cepas aisladas, tales como *Vibrio fluvialis* 82 %, *Arthrobacter mysorens* 81 %, *venetianus* 77 % y *Exiguobacterium profundum* 77 % en función a la concentración inicial del TPH del suelo.

AUSAMA, Ahmed, *et al.* (2014), realizó un estudio titulado “Biodegradation of Crude Oil in Contaminated Water by Local Isolates of *E. cloacae*” cuyo objetivo fue estudiar la capacidad de *E. cloacae* para degradar el petróleo crudo en agua contaminada. Sus resultados indicaron que Después de 30 días de incubación, *E. cloacae* El degradó  $70.00 \pm 0.40\%$  del petróleo crudo, lo cual demostró que *E. cloacae* es una eficiente bacteria en la degradación del petróleo crudo.

### 1.3. Teorías relacionadas al tema

#### 1.3.1. Normas nacionales.

##### a. Eca suelos – hidrocarburos de petróleo

A continuación, se muestra un cuadro resumen del estándar de calidad ambiental para suelo de acuerdo al método de ensayo de la EPA.

Tabla 1: Usos de suelo – Estándares de calidad ambiental, Ministerio del ambiente.

Parámetros en mg/kg PS	Usos del Suelo		
	Suelo Agrícola	Suelo Residencial/ Parques	Suelo Comercial/ Industrial/ Extractivo
Fracción de hidrocarburos F1 (11) (C6-C10)	200	200	500
Fracción de hidrocarburos F2 (12) (>C10-C28)	1200	1200	5000
Fracción de hidrocarburos F3 (13) (>C28-C40)	3000	3000	6000

Fuente: D.S. N° 011-2017-MINAM

#### 1.3.2. Generalidades de los hidrocarburos

Una de las características importantes y que determina la calidad del petróleo crudo viene a ser su densidad cuya expresión se determina en grados API (American Petroleum Institute) clasificándose en ligeros > 35° API, medios 24° -35° API, pesados < 24°API esto debido a la composición hidrocarbonada el porcentaje de densidad será menor cuando la relación que existe entre carbono e hidrogeno sea mayor. (HUITRÓN, 2013, p. 12-15).

#### 1.3.3. Degradación de hidrocarburos en suelo

La degradación de hidrocarburos por microorganismo se convierte en una importante técnica remediadora, técnica ambientalmente viable genera la recuperación de este ecosistema alterado, el termino degradación se conceptualiza como un determinado proceso que permiten que la alteración física química y biológica causada por un agente contaminante sea oxidado, degradado en incluso transformado (PURISACA y QUEVEDO, 2015, p.18).

Para realizar una biodegradación de hidrocarburos es necesario tener conocimiento del suelo que será tratado, las características tanto físicas, químicas de este recurso, para ello se requiere hacer un previo análisis como pH, humedad, temperatura, nutrientes que este posee ya que al estar contaminado con hidrocarburos este va a contener otro tipo de características e incluso es importante la evaluación de la estructura química que posee el hidrocarburo que impactó el suelo estudiado. (ANZA, et al, 2016, p. 13).

#### **1.3.4. Bacteria *Enterobacter cloacae*.**

##### **a. Taxonomía y clasificación**

El género *Enterobacter* se define por ser bacilos gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, están presentes en el agua y suelo, además forma parte de la microbiota de animales insectos y tracto intestinal humano, es facultativamente-anaeróbica, mide 0.3-0.6 x 0.8-2.0  $\mu\text{m}$ ; vive en un ambiente mesófilo con su temperatura óptima a 37 °C y utiliza sus flagelos peritrícos para su movimiento. Este microorganismo es oxidasa negativa, catalasa positiva y es facultativo anaeróbico. (DEBAJIT, 2017, p. 43).

##### **b. Morfología macroscópica.**

En agar MacConkey las colonias se muestran redondas, transparentes, chicas, con borde entero, convexa, cremosa y no trasmite luz. (FLORES, 2004)



Figura 1: *E. cloacae* morfología en placa Petri

##### **c. Morfología microscópica**

La vista en forma microscópica se aprecia bacilos Gram negativos, cortos, simples, se presentan como bastones rectos con un tamaño entre 0.6 y 10 nm de grosor y de 1.2 a 3.0 nm de largo. (FLORES, 2004)



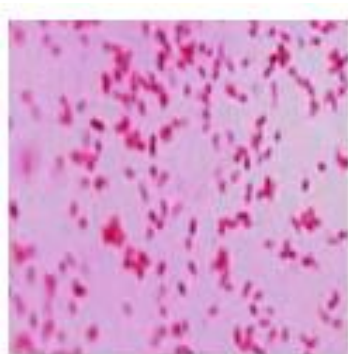


Figura 2: *E. cloacae* morfología microscópica

**d. Hábitat de *E. cloacae***

Debido a que es una bacteria anaerobia facultativa puede desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno, es fácil de adaptarse debido a esta característica se encuentra en aguas residuales y suelo. Es una bacteria Gram Negativa porque contiene una cantidad relativamente baja de peptidoglicano. (QOMARUDIN y RUDY, 2014, p. 326 - 333).

**e. Interés del género.**

Se muestra interés en la investigación del género debido a que han adquirido gran relevancia sobre la metabolización de una extensa variedad de metales pesados y contaminantes aromáticos peligrosos, este género es considerada potencialmente biotecnológica por su capacidad de transformación de compuestos tóxicos a menos contaminantes, las cepas aisladas del medio ambiente son capaces de degradar varios tipos de compuestos aromáticos. B-ketoadipato es la ruta principal donde el aromático o compuesto de petróleo entra en el metabolismo central. Mientras que en otros microorganismos no generan la concentración en la parte central, como consecuencia provee menor porcentaje de degradación (RADA, Jaime. 2016 p. 27).

La mayoría de bacterias degradadoras de hidrocarburos están presentes en el grupo de Gram negativas y destacan por tener polisacáridos en las membranas que ayudan a la fermentación y producción de diversas enzimas. (LUCAS et al, 2003, p.34)

### 1.3.5. Efectos del petróleo en el suelo

Las características físicas se observan en la textura, genera cierto grado de compactación, reduce su microporosidad del suelo por el aumento de materia orgánica debido a los componentes que contiene el petróleo. Además, genera el aumento de nitrógeno por la acumulación de microorganismos que oxidan al petróleo, aumento en el porcentaje normal del fósforo, formando fosfato de hierro y este no es favorable para el suelo. Una característica importante también viene a ser la alteración del pH mayor a 7 u 8 unidades. (MARTINEZ y ALVAREZ, 2017, p. 955-970).

### 1.3.6. Principios básicos del proceso de biorremediación

Los principios que se establecen en el proceso de biorremediación consisten en reducir la toxicidad de los agentes contaminantes.

**1° principio:** El microorganismo insertado, metabólicamente cataliza las reacciones de eliminación de contaminantes.

**2° principio:** El contaminante eliminado depende de la concentración del catalizador o de la biomasa activa.

**3° principio:** Los microorganismos insertados, crecen y se mantienen utilizando los contaminantes como sustratos primarios generadores de electrones y energía. (OTINIANO, 2017, p. 14-15).

### 1.3.7. Tecnologías físico-químicas para eliminar petróleo del suelo.

Las tecnologías para recuperar un suelo contaminado con petróleo dependen de la aplicación de degradación, *ex situ* se escava el suelo contaminado; *e in situ* no se escava el suelo contaminado. (ALONSO, 2012, p. 21).

Tabla 2: Clasificación para la recuperación de suelos contaminados Físicoquímicas.

EX SITU	IN SITU
Extracción con disolventes	Extracción con vapor
Lavado	Lavado
Oxidación/Reducción	Solidificación/Estabilización
Deshalogenación química	Electrorecuperación

Fuente: ALONSO, Raquel. 2012. 21 p.

### **1.3.8. Tecnologías ambientales de degradación de petróleo en suelo.**

La aplicación y uso de tecnologías se escogen de acuerdo al grado de remediación que se quiere alcanzar, a continuación, se describen algunas tecnologías ambientales que ayudan a mitigar los impactos en el medio ambiente y la población (ALONSO, 2012, p. 21).

#### **a. Desorción térmica**

Consiste en calentar el suelo contaminado de tal manera que el contaminante llegue a volatilizarse, como consecuencia se generan emisiones a la atmosfera.

#### **b. Extracción con disolventes**

Se utiliza disolvente para remover los contaminantes, de este modo se concentra a las sustancias para eliminarlas.

#### **c. Lavado del suelo**

Ex situ: Se combina agua con aditivos dependiendo de los contaminantes a remover. El líquido es utilizado para depurar el suelo y separar el suelo del contaminante.

In situ: La técnica se da mediante el mojado del suelo contaminado con una solución que puede ser agua con ácido o base, sin embargo, el tratamiento es utilizado a suelo con arcilla o limo.

#### **d. Biorremediación**

Esta técnica consiste en la utilización de microorganismos naturales para degradar sustancias y reducir las el porcentaje menores.

### **1.3.9. Microorganismos degradadores de hidrocarburos.**

#### **a. Función de las bacterias en el proceso de biorremediación.**

Los expertos determinaron que los microorganismos especialmente las bacterias, podrían utilizar los hidrocarburos de petróleo como fuente de alimento y energía. alguna de las investigaciones mencionaba que los microorganismos eran consecuentes de la descomposición de aceites en el suelo. Oxidan el petróleo a dióxido de carbono, agua y energía, el 50% del

carbono lo utilizan como biomasa bacteriana. No obstante, existen algunos hidrocarburos muy resistentes (HPAS), de manera que no son degradados totalmente, pero sí, son oxidados parcialmente (ADAMS, *et al*, 1999, p. 162).

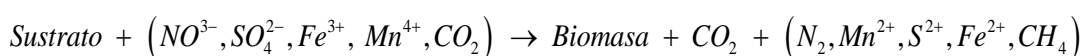
#### **b. Reacciones químicas presentes en este proceso**

La biodegradación se basa en tener reacciones oxido-reducción, para obtener energía. El oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sustratos, el CO<sub>2</sub>, son los aceptores más utilizados. De manera que cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones, el proceso microbiano se produce en condiciones aeróbicas. Por otro lado, al utilizar el dióxido de carbono y sulfatos se liberan electrones y será de tipo anaeróbico por las condiciones reductoras (TORRES y ZULUAGA, 2009, p. 37).



Degradación aerobia:  $\text{Sustrato} + \text{O}_2 \rightarrow \text{biomasa} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

Degradación anaerobia:



### **1.4. Formulación del problema**

¿En qué porcentaje influye *E. cloacae* en la degradación de petróleo presente en suelos de Negritos – Piura, 2018?

### **1.5. Justificación del estudio**

La siguiente investigación busca aportar con una alternativa de solución a la contaminación del suelo a causa de los derrames de hidrocarburos, con tecnologías que sean amigables con el medio ambiente y que su costo de aplicación sea bajo. Existe una gran necesidad de mitigar los problemas ambientales generados por los contaminación de petróleo que con mayor incidencia vienen ocurriendo en los lugares donde se encuentra las empresas petroleras o en pozos que ya han sido explotados y quedan restos de petróleo; mediante el uso de bacterias con capacidad biorremediadora se aportará a la solución de este problema.

## 1.6. Hipótesis

Hi: La concentración de *E. cloacae*, influye en la degradación de petróleo presente en suelos de Negritos – Piura, 2018.

H0: La concentración de *E. cloacae*, no influye en la degradación de petróleo presente en suelos de Negritos – Piura, 2018.

## 1.7. Objetivo

### 1.7.1. General

Evaluar la influencia de las concentraciones de *E. cloacae* en el porcentaje de degradación de petróleo presente en suelos de Negritos – Piura, 2018.

### 1.7.2. Específicos

- Aislar e identificar *E. cloacae* del suelo procedente de Negritos – Piura, 2018.
- Analizar el grado de contaminación inicial en (g/kg de suelo) de Hidrocarburos Totales de Petróleo.
- Calcular el porcentaje de degradación de petróleo de *Enterobacter cloacae* al término del experimento.
- Comparar el porcentaje de degradación de petróleo con respecto al tiempo.

## II. MATERIAL Y MÉTODO

### 2.1. Tipo y diseño de investigación

El tipo de estudio fue aplicado, según el grado de manipulación de la variable independiente (concentración de *E. cloacae*) fue experimental, a continuación, se presenta el esquema del diseño de la investigación.

Tabla 3: Diseño de investigación, tratamientos analizados en el tiempo.

ANALISIS	DIAS	TRATAMIENTOS					
		T <sub>1</sub>			T <sub>2</sub>		
A <sub>1</sub>	10	R1	R2	R3	R1	R2	R3
A <sub>2</sub>	20	R1	R2	R3	R1	R2	R3

A <sub>3</sub>	30	R1	R2	R3	R1	R2	R3
M <sub>0</sub>		R1					
Muestras		9 R			9R		
Total Muestras a analizar					19		

Fuente: Propia

**LEYENDA:**

T1: Inóculo de *E. cloacae* 14\*10<sup>6</sup>.

T2: Inóculo de *E. cloacae* 14\*10<sup>10</sup>.

M<sub>0</sub>: Muestra testigo.

R1: Primera repetición

R2: Segunda repetición.

R3: Tercera repetición.

A1: Análisis en 10 días.

A1: Análisis en 20 días.

A1: Análisis en 30 días

**Fórmula para calcular el porcentaje de remoción de la bacteria**

$$R\% = \frac{(X1-X2)}{X1} * 100$$

R%: Porcentaje de remoción.

X<sub>1</sub>: Concentración inicial de Petróleo.

X<sub>2</sub>: Concentración final de petróleo.

**2.2. Operacionalización de variables**

**2.2.1. Independiente**

- *Enterobacter cloacae* y tiempo

**2.2.2. Dependiente**

- Degradación de petróleo en suelos de Negritos Piura.

**2.3. Población, muestra y muestreo**

**2.3.1. Población**

- La población estuvo constituida por los suelos contaminados con petróleo en el distrito de Negritos provincia de Talara.

**2.3.2. Muestra**

- La muestra fue de 7.0 Kg de suelo extraídos de los diferentes pozos abandonados de petróleo.

## 2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

La técnica que se empleó en la recolección de la muestra fue la observación directa de los pozos abandonados con petróleo, y el instrumento fue una ficha de registro de datos.

### 2.4.1. Descripción del procedimiento

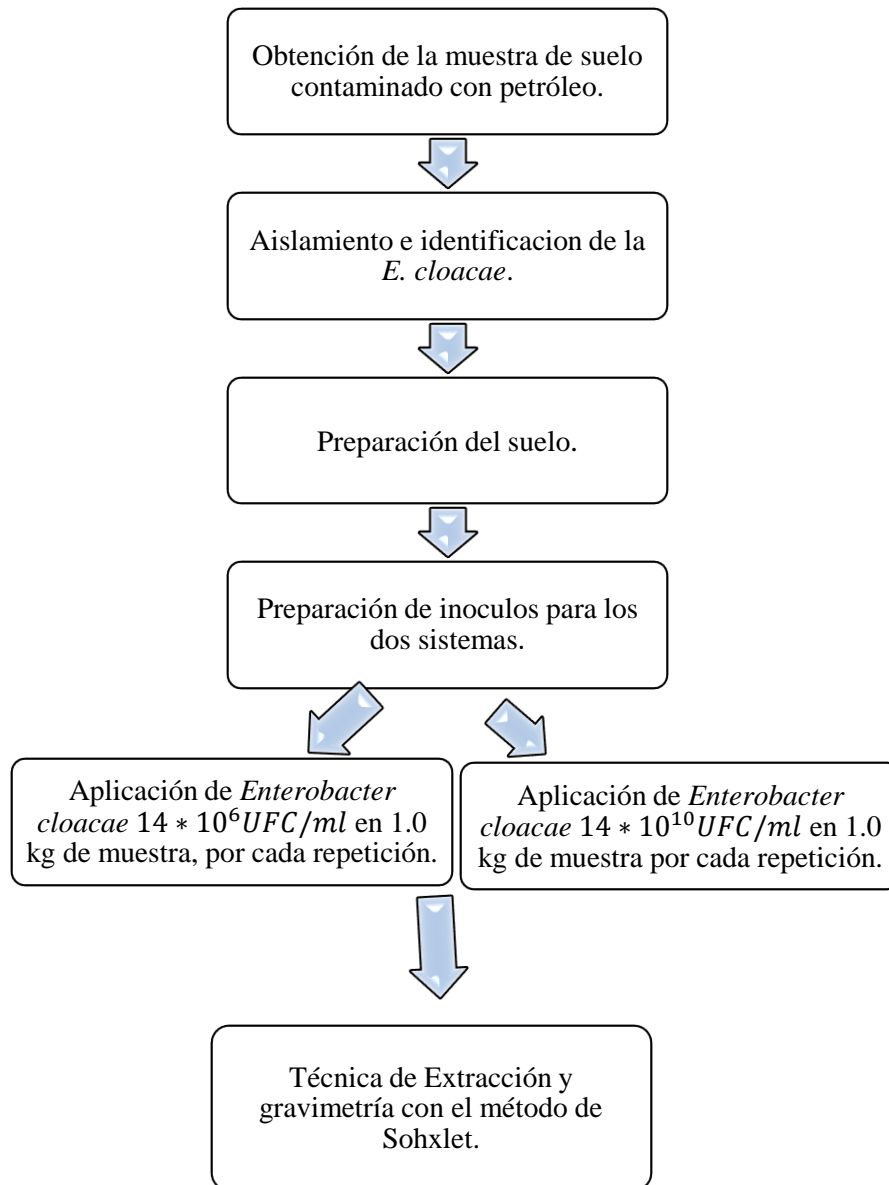


Figura 3: Diseño del procedimiento experimental en inicio a fin.

## 2.5. Procedimiento

### 2.5.1. Obtención de la muestra

La muestra fue recolectada de los pozos abandonados con restos de petróleo ubicados en el distrito de Negritos – Piura.

A continuación, se precisa la ubicación de los pozos abandonados con presencia de hidrocarburos, cabe mencionar que de estos pozos fue sacada la muestra para los tratamientos. (Figura 6).

Tabla 4: Pozos Abandonados con Petróleo - Negritos

<b>Ubicación de los pozos abandonados</b>		
<b>Coordenadas UTM.</b>		
<b>PUNTOS</b>	<b>ESTE</b>	<b>NORTE</b>
<b>1</b>	474541.56 m E	9491671.16 m S
<b>2</b>	474305.35 m E	9491669.99 m S
<b>3</b>	474198.60 m E	9491609.08 m S
<b>4</b>	473909.90 m E	9490765.12 m S
<b>5</b>	473414.62 m E	9490348.02 m S

### 2.5.2. Identificación De E. Cloacae

La identificación de E. cloacae fue realizada por el Laboratorio Loayza Murakami SAC., con los siguientes pasos:

### 2.5.3. Aislamiento de E. cloacae

Se recolectó 1 Kg de suelo contaminado con petróleo en una bolsa de primer uso y se trasladó al laboratorio, después de homogenizarlo se procedió a pesar 5 gr. de la muestra en frascos estériles de 100 mL que contenían Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI), la incubación se realizó a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Luego del tiempo de incubación, el crecimiento de bacterias se evidenció por la turbiedad del medio, (Figura 7 y Figura 8).



#### **2.5.4. Caracterización de E. cloacae**

Antes de iniciar la caracterización fue necesario verificar la pureza de las colonias aisladas, mediante la coloración Gram; observándose su forma bacilar y la respuesta negativa a la tinción (Figura 11). Los cultivos puros que presentaron las características anteriores fueron sometidos a una caracterización posterior según el Manual de Bergey's (Figura 12) y Silva y Martínez 2018. (Tabla 11), para finalmente seleccionar un cultivo para ser utilizado en la presente investigación.

##### **- Prueba en Fermentación**

Para esta prueba se utilizaron tubos conteniendo Agar Hierro Tres Azúcares (TSI) inclinado, se sembró por puntura con un asa de siembra y se incubó a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. El crecimiento y la aparición de un color amarillo en todo el medio, presencia de gas y ausencia de  $\text{H}_2\text{S}$ , después de la incubación se consideró un resultado positivo para E. cloacae (A/A+,-) (Figura 13 y Figura 14).

La fermentación se da mediante el proceso de óxido reducción, este se detecta por color en indicadores de pH formándose productos ácidos lo cual sería una interpretación positiva, por lo contrario (alcalina) sería negativa.

##### **- Prueba de descarboxilación**

Para esta prueba se utilizaron tubos conteniendo Agar Lisina Hierro (LIA) inclinado, se sembró por puntura con un asa de siembra y se incubó a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. El crecimiento y la aparición de un color Púrpura en la mitad del medio después de la incubación se consideran un resultado positivo (K/A), (Figura 13 y Figura 14). El indicador negativo es debido a la fermentación produce ácido, el cual hace virar el indicador a color amarillo (resultado negativo). En la descarboxilación de la lisina se producirá una amina, la cual neutralizará el ácido producido por la fermentación retornando el medio al color purpura indicando resultado positivo.

##### **- Prueba de Citrato**

Para esta prueba se utilizaron tubos conteniendo Agar Citrato de Simons inclinado, se sembró por puntura con un asa de siembra y se incubó a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. El crecimiento y la aparición de un color azul intenso en todo

el medio después de la incubación se consideró un resultado positivo para *E. cloacae* (Figura 11 y Figura 12).

El metabolismo del citrato es comprendida por una condensación de acetilo con la coenzima A y Oxalacetato para el ingreso en ciclo de Krebs. La interpretación de la prueba de citrato depende del pH del medio, cuando este es positivo existe crecimiento, aunque no cambie color o crece y el medio de color azul intenso en pico de flauta, por lo contrario, no se observará crecimiento y el medio será de color verde.

#### - **Prueba de Movilidad**

Para esta prueba se utilizaron tubos conteniendo Medio Sulfuro Indol Movilidad (SIM), se sembró por puntura con un asa de siembra y se incubó a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. El crecimiento en todo el medio después de la incubación se consideró un resultado positivo para *E. cloacae* (Figura 13 y Figura 14).

#### - **Prueba de Indol**

Para esta prueba se utilizaron tubos conteniendo Agua de Triptona (AT), se sembró con un asa de siembra y se incubó a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. El crecimiento y la aparición de un halo amarillo intenso en la parte superior del medio después de la incubación cuando se agregó el Reactivo de Kovacs. (Figura 13 y Figura 14).

La formación de indol se produce solamente en aquellos organismos capaces de fermentar los hidratos de carbono, por consiguiente, será positivo si el medio existe ennegrecimiento caso contrario será negativo.

#### **2.5.5. Preparación del suelo**

- El suelo fue tamizado en un tamiz de  $850\ \mu\text{m}$  (N° 20 de diámetro) y homogenizada con el propósito de evitar sesgo.
- Posteriormente este suelo fue esterilizado en una estufa a una temperatura de  $150^{\circ}\text{C}$  con la finalidad de eliminar microorganismos.
- Finalmente, *E. cloacae* fue sometida a prueba durante 30 días y se extrajo una muestra de 5 gr cada 10 días para evaluar la degradación de petróleo por la bacteria.

### 2.5.6. Preparación del inóculo

A partir del cultivo de BHI, se realizaron siembras por estría en Agar MacConkey incubándose a  $35\pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se consideró un resultado positivo al crecimiento de colonias características (colonias rosadas). Luego, los cultivos positivos se sembraron en tubos conteniendo Agar Soya Tripticasa (TSA) inclinado, incubándose a  $35\pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 horas.

- Se contabilizó la bacteria en placa.
- Se aplicó la siguiente fórmula para la determinación del inóculo:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{N}^\circ \text{colonias por placa} * \text{factor de dilución}}{\text{ml de muestra sembrada}}$$

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{14 * 10^6}{1\text{ml}}$$

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = 14 * 10^6$$

- Para el Tratamiento 1 se inoculó  $14 \times 10^6$
- Para el Tratamiento 2 se inoculó  $14 \times 10^{10}$

### 2.5.7. Técnica de extracción y gravimetría.

Para determinar la cantidad de petróleo presente en el suelo se utilizó la determinación de grasas y aceites por el metodo soxhlet, según el código TP0150:

#### Aparatos

- Extractor Soxhlet BÜCHI B-810.
- Bomba de vacío.
- Cabina extractora de vapores orgánicos
- Balanza analítica de cuatro cifras decimales
- Horno de secado
- Rotavapor (para la recuperación del solvente)
- Desecador grande

## **Reactivos**

- Ácido clorhídrico, HCl concentrado o Acido sulfúrico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado
- Hexano, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>, punto de ebullición 69°C, libre de residuos.
- Suspensión para ayuda de filtración, tierra de diatomáceas, 10g/L. Suspende 10 g de la tierra de diatomácea en 1 L de agua destilada.
- Aceite de origen vegetal o mineral.

## **Materiales**

- Embudo Buchner, de 12 cm de diámetro.
- Dedal de extracción de vidrio.
- Papel de filtro, de 11 cm de diámetro cuantitativo (Whatman N° 40 o equivalente)
- Discos de muselina.
- Pinzas, metálicas.
- Frasco lavador.
- Vaso de precipitado de 50 mL
- Varilla de vidrio

### **2.5.8. Filtración y Extracción**

Primero se consignó los datos en las casillas superiores del formato de captura de datos TF 0067, luego aforamos la botella demarcando el nivel de la muestra y con la ayuda de la varilla de vidrio se adicionó poco a poco y cuantitativamente la muestra a través del lecho filtrante evitando pérdidas por el borde del papel, luego se filtró la muestra cuantitativamente, utilizando varilla de vidrio para cada uno. Aplique vacío hasta cuando no pase más agua a través del lecho filtrante. Se dobló el papel filtro y fue transferido al dedal de extracción. Tanto el dedal con las muestras, el recipiente de la muestra y la varilla empleada en la filtración fue expuesta en el horno a 103°C durante 30 minutos para ser llevados al extractor Soxhlet y posteriormente se pesó los vasos de extracción para que posteriormente sean enjuagados con solvente el recipiente que contenía la muestra y la varilla de filtración y fueron transferidos el enjuague al vaso de

extracción para recuperar el material graso adherido a las paredes del recipiente se adicionó el solvente al vaso de extracción hasta 150 mL para la extracción (aproximadamente el 90% del volumen total del vaso de extracción) y fue llevado a la plancha de calentamiento del equipo extractor. Se cerró equipo verificando que haya sellado correctamente (el vaso no gira, ajuste el vaso al sello del soxhlet) y se comprobó que la palanca situada en la parte superior derecha del equipo está en la posición “closed” para ser conectado el baño de aceite y se verificó que la temperatura de calentamiento es de 110 °C e inmediatamente el suministro de agua de refrigeración seguidamente se llevó a cabo la extracción durante 4 horas a partir del primer sifón que realice el equipo acabada la etapa de extracción la válvula de drenaje (posición open) fue abierta para la recuperación del solvente y el secado de los vasos de extracción, se apagó y desconecte el baño de aceite, deje el flujo de agua hasta que el equipo se enfríe (aprox. una hora) y se retiró los vasos con la grasa obtenida en la extracción, luego se llevó los vasos a la cabina extractora para eliminar el solvente residual y finalmente se determinó el peso final.

Finalmente se pesó el vaso de precipitación con el petróleo residual y se realizó los cálculos correspondientes.

$$\text{mg de grasas y aceites/kg} \frac{(A-B)}{m} \times 10^6$$

Donde: A= peso en miligramos del balón más el analito

B= peso en miligramos del balón.

m= masa en miligramos de la muestra inicial de suelo.

## 2.6. Método de análisis de datos

Para comparar la degradación de petróleo con *E. cloacae* de los dos tratamientos provenientes de la misma población, estadísticamente se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) mediante el software IBM SPSS Statistics 24, con un nivel de confianza del 95% y una significancia  $p < 0.05$ , para contrastar la hipótesis, esta evaluación se realizó con el propósito observar el nivel significancia.

Además, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de tukey en el software IBM SPSS Statistics 24 para observar cuál es el mejor tratamiento.

## 2.7. Aspectos éticos

La presente investigación contiene información confiable bajo los siguientes criterios:

- Autenticidad de datos.
- Honestidad.
- El respeto a la producción intelectual de otros autores.

## III.RESULTADOS

A continuación, mencionaremos los siguientes términos que serán utilizados en la redacción de los resultados:

T <sub>0</sub> : Tiempo inicial	T <sub>3</sub> : Tiempo 3 – 30 días.
T <sub>1</sub> : Tiempo 1 – 10 días.	T1: Tratamiento 1 (14*10 <sup>6</sup> UFC/ml)
T <sub>2</sub> : Tiempo 2 – 20 días.	T2: Tratamiento 2 (14*10 <sup>10</sup> UFC/ml)

Los resultados obtenidos en la presente investigación corresponden al proceso de evaluación de los dos tratamientos, donde se analizó la muestra testigo, T1 y el T2 en el T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>.

### 3.1. Aislamiento e identificación de *E. cloacae*

En la Tabla 5 se muestra el aislamiento e identificación de *E. cloacae* lo cual se realizó en el laboratorio LOAYZA MURAKAMI SAC.

Tabla 5: Informe de Ensayo *E. cloacae*

Parametro	Medio de cultivo	
Fermentación de Glucosa	TSI	+
Fermentación de Lactosa	TSI	+
Fermentación de Sacarosa	TSI	+
Producción de Gas	TSI	+
Producción de H <sub>2</sub> S.	TSI	-
Descarboxilación de Lisina	LIA	-

Desaminación de Lisina	LIA	-
Prueba de Citrato	CITRATO	+
Prueba de VP-RM	VP-RM	+/-
Prueba de Movilidad	SIM	+
Prueba de Indol	Agua de Triptona	-

\*La bacteria identificada corresponde *Enterobacter cloacae*.

Fuente: LOAYZA MURAKAMI SAC.

De esta tabla se interpreta que *E. cloacae* tiene fermentación de glucosa (+), fermentación de lactosa (+), fermentación de sacarasa (+), producción de gas (+), citrato (+), VP – RM (+/-) y movilidad (+) siendo estas las pruebas bioquímicas más relevantes considerándose positivas.

### 3.2. Análisis de TPH inicial

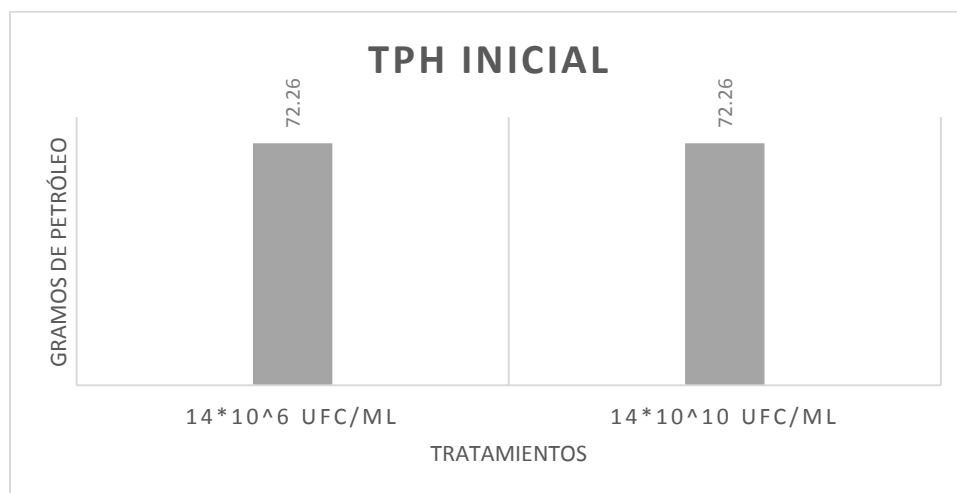


Figura 4: Concentración inicial de petróleo en el suelo.

En la figura 4 se muestra que la cantidad inicial de petróleo es **72,26 g/kg** de suelo esta cantidad se determinó mediante el método Extracción y gravimetría de Soxhlet antes de iniciar con el proceso de tratamiento.

### 3.3. Porcentaje de degradación de petróleo de *Enterobacter cloacae* al termino del experimento.

En la Tabla 6 se muestra los promedios de petróleo expresado en gramos y la respectiva desviación estándar.

Tabla 6: Promedios de tratamientos en relación al tiempo expresado en gramos de petróleo.

	TRATAMIENTO 1		TRATAMIENTO 2	
TIEMPO (días)	Petróleo (g)	DE	Petróleo (g)	DE
0	72.26	---	72.26	---
10	60.97	3.59691	58.09	2.28056
20	48.90	1.64292	42.77	. 18903
30	34.68	3.03308	27.75	2.97297

Fuente: Propia

En esta tabla se observa que la cantidad de petróleo más baja está en el último análisis del T2 ( $14 \cdot 10^{10}$  UFC/ml) donde se pesó 27.75 gr/kg de petróleo, esta cifra tiene una desviación estándar de 2.97g. respecto a los promedios.

En la tabla 7 se compara los porcentajes de degradación del petróleo para los dos tratamientos, respecto al tiempo.

Tabla 7: Porcentaje de degradación de TPH con el tiempo.

DÍAS	TESTIGO	T1	T2
0	0%	00%	00%
10	0%	15.63%	19.62%
20	0%	32.33%	40.81%
30	0%	52.01%	61.59%

Fuente: Propia

Se observa que el porcentaje de degradación al termino del experimento (30 días), la remoción más notable de TPH fue la del tratamiento  $14 \cdot 10^{10}$  UFC/ml equivalente a un 61.59% de degradación, esta cifra tiene una desviación estándar de 2.97 g.

### 3.4. Porcentaje de degradación de petróleo con respecto al tiempo.

En la tabla 8 se comparará la diferencia de porcentajes de degradación con respecto al tiempo de experimento.



Tabla 8: Diferencias de porcentajes de degradación con respecto al tiempo.

<b>TIEMPO</b> (días)	<b>T1</b>	<b>T2</b>
<b>0</b>	-	-
<b>10</b>	15.63%	19.62%
<b>20</b>	16.7%	21.19%
<b>30</b>	19.68%	20.78%

Fuente: Propia

Se observa que la mejor de degradación de petróleo, se dio en el tratamiento 2 a los 20 días, por tener una diferencia de porcentaje de 21.19% con respecto al resto de diferencias porcentuales.

### 3.5. Influencia de la concentración de *E. cloacae* en la degradación de petróleo.

En la siguiente figura se muestra la influencia de *E. cloacae* por los dos tratamientos en la degradación de petróleo.

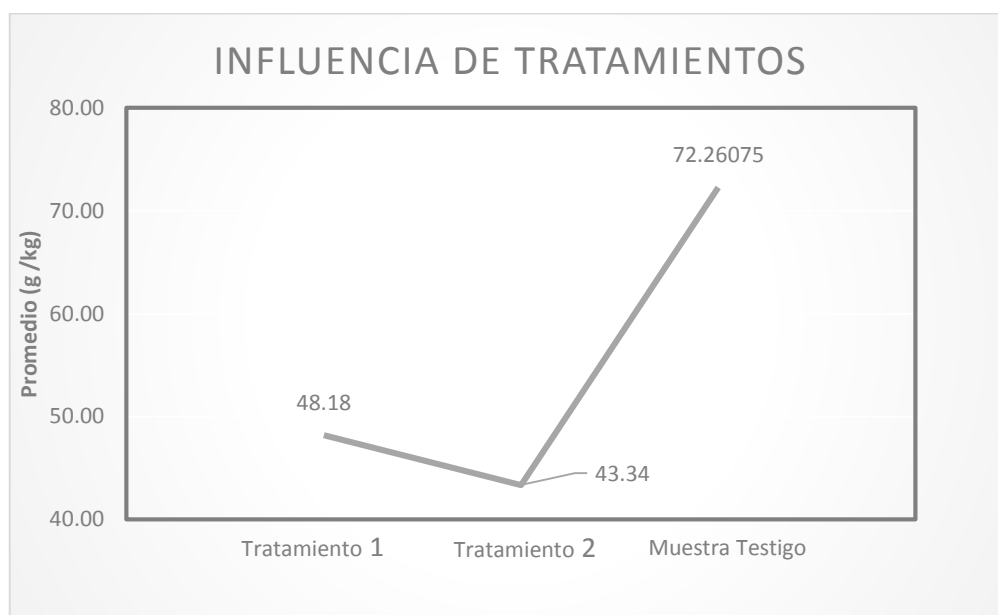


Figura 5: Influencia de tratamiento en la degradación de hidrocarburos totales de petróleo.

Fuente: Propia

En la figura 5 se muestra que *E. cloacae* en el tratamiento dos tiene mayor influencia en la degradación, por presentar menor cantidad de petróleo.

### 3.6. Análisis Estadístico.

En la Tabla 9 se muestra el análisis de varianza (ANOVA), donde se expresa la diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) del nivel de degradación de los dos tratamientos respecto al tiempo, por lo tanto se acepta la hipótesis H1: La concentración de *E. cloacae*, influye en la degradación de petróleo presente en suelos de Negritos – Piura, 2018.

Tabla 9: ANOVA para la degradación de petróleo

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	55498,461 <sup>a</sup>	9	6166,496	950,844	,000
TRATAMIENTO	1958,251	2	979,125	150,976	,000
TIEMPO	969,589	2	484,795	74,753	,000
TRATAMIENTO * TIEMPO	352,060	4	88,015	13,571	,000
Error	77,823	12	6,485		
Total	55576,284	21			

a. R al cuadrado = ,999 (R al cuadrado ajustada = ,998).

Fuente: Propia

En la siguiente tabla. Se muestra la comparación de los 2 tratamientos ( $14 \times 10^6$  y  $14 \times 10^{10}$  UFC/ml) y su relación con la muestra testigo entre la diferencia de promedios de los tratamientos.

Tabla 10: Comparaciones de promedios entre tratamientos.

TRATAMIENTO	COMPARACIONES	Diferencia de promedios (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>
Tratamiento 1	Tratamiento 2	5,311*	1,200	,001
	Muestra Testigo	-24,031*	1,698	,000
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-5,311*	1,200	,001
	Muestra Testigo	-29,342*	1,698	,000
Muestra Testigo.	Tratamiento 1	24,031*	1,698	,000
	Tratamiento 2	29,342*	1,698	,000

\*. La diferencia de promedios es significativa en el nivel .05.

Según el análisis estadístico tukey se puede observar que la muestra que el T1 y T2 ambos difieren significativamente en la degradación de petróleo debido a que el nivel de significancia es  $< 0.005$ .

#### IV. DISCUSIÓN

Las pruebas bioquímicas de fermentación, producción de gas y pruebas de citrato son características principales de *E. cloacae* para la degradación de hidrocarburos tal como lo asegura Varela y Grotiuz (2007) indicando que en la fermentación, los electrones pasan del carbono, hacia un aceptor constituido por algún otro intermediario orgánico, en las bacterias se encuentran las tres vías centrales del metabolismo intermediario de los hidratos de carbono tales como la glucolítica, la pentosa y la de Entner-Doudoroff, para Lujan (2014) La prueba de citrato implica que la bacteria va a obtener energía de la fermentación de los hidratos de carbono, para la producción de subproductos alcalinos, asimismo indica que la producción de gas es el paso final de la descomposición de las sustancias orgánicas en condiciones anaeróbicas, Durante las fases de la descomposición todos los aceptores quedan reducidos excepto el CO<sub>2</sub>, que es un producto de la mayoría de los procesos catabólicos.

En la Tabla 5 según los resultados obtenidos, ambos tratamientos degradan considerablemente este compuesto orgánico, a partir del antecedente de Ausama *et al* (2014), indica que *E. cloacae* produce un tipo de biosurfactante, este compuesto anfifílico se usa para separar materiales oleosos de un medio particular y a su vez presenta una glicoproteína que contiene glucosa y galactosa en su grupo carbohidrato, esto le permite degradar altos porcentajes de petróleo. Según Van (2003) para que una bacteria asimile hidrocarburos y los utilice como fuente de energía al carbono, depende de la especificidad de sus enzimas. Por lo tanto, se supone que *E. cloacae* por ser una bacteria degradadora de petróleo que posee enzimas como la fenilalanina, deshidrogenasa y endoglucosidasas útiles para este proceso degradativo.

En la tabla 6, se detalla que el mayor porcentaje de degradación fue al finalizar los 30 días disminuyendo el 61.59% de petróleo presente en el suelo, al comparar con los resultados de Anza (2014) este autor utilizó bacterias nativas como

*Acinetobacter sp*, *Sphingobacterium sp* y *Stenotrophomona sp*. Su inóculo fue de  $10^8$ , y estas removieron 94.8% de hidrocarburos en 90 días, este porcentaje de remoción es elevado debido a que utilizaron más días de tratamiento.

Asimismo, en cuanto al porcentaje de degradación del tratamiento dos, resultó similar a los de Ausama (2014) que utilizó esta misma bacteria para degradar petróleo en aguas durante 30 días y aquí obtuvo un 70 % de efectividad. De la misma forma, Samanez (2013), evaluó la biodegradación de Hidrocarburos y determinó que la mayor degradación de TPH se realizó a los 30 días por tener un mayor desarrollo poblacional respecto a los 90 días es su investigación, utilizó *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* presentaron 71.40% de remoción.

## V. CONCLUSIONES

- *E. cloacae* es un microorganismo que ha logrado altos porcentajes de remoción de hidrocarburos en el suelo, en la presente investigación se determinó que el tratamiento 2 de *E. cloacae* con  $14 \times 10^{10}$  UFC/ml tiene mayor influencia en la degradación de petróleo que el tratamiento 1 de *E. cloacae* con  $14 \times 10^6$  UFC/ml, por lo tanto se afirma que es factible utilizar esta bacteria para descontaminar suelos con hidrocarburo.
- La bacteria se aisló del mismo suelo empleado para los tratamientos procedente del distrito de negritos, Piura e identificó *E. cloacae* realizado las siguientes pruebas: fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa, producción de gas, prueba de citrato, VP-RM y movilidad.
- El análisis inicial para la determinación de petróleo en el suelo se realizó por el método de extracción y gravimetría usando el extractor de Soxhlet y se determinó que la cantidad inicial de petróleo fue de 72.26 g/kg.
- Se comparó la diferencia de porcentajes con respecto a los análisis y tratamientos, y se concluyó que en el análisis 2 (20 días) del tratamiento 2, *E. cloacae*  $14 \times 10^{10}$  UFC/ml, tuvo mayor degradación siendo este de 21.19%.
- Finalmente se concluyó que a los 30 días *E. cloacae*  $14 \times 10^{10}$  UFC/ml, alcanzó una tasa de remoción del 61.59% al finalizar los días de tratamiento.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar análisis a *E. cloacae* de su estructura molecular. Se propone como recomendación para evaluar el comportamiento específico de esta especie en la degradación de hidrocarburos totales de petróleo.
- Involucrar las variables en el estudio como: pH, temperatura, humedad, disponibilidad de oxígeno y velocidad de degradación, etc. A fin de observar los factores eficientes y a condiciones óptimas que se le somete a *cloacae* para degradar petróleo.
- Investigar un consorcio bacteriano e incluir a *E. cloacae* para degradar la composición del hidrocarburo de petróleo.
- Realizar un análisis inicial y final de suelo físico químico y microbiológico, en primera fase, realizar el análisis inicial que consistiría en saber qué características (Diagnostico) tiene antes de empezar el experimento, y en segunda fase, realizar el análisis final para saber qué características disminuye, aumenta, se transforma, o se produce después del experimento.
- Se recomienda realizar tratamientos in-situ a fin de saber si la bacteria se adapta en condiciones ambientales.
- Se recomienda el uso de estiércol de aves, plantas reductoras de hidrocarburos y bacterias para realizar comparaciones respecto al costo y tiempo empleado en la degradación del hidrocarburo totales de petróleo.

## VII. REFERENCIAS

ALONSO, Raquel. Proyecto de recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos. Proyecto Tesis (Ingeniera Química Industrial). Cerdanyola del Vallès: Escuela de Ingeniería Industrial, 2012. 21 p.

ANZA Héctor., *etal.* Biorremediación de suelos contaminados con aceite automotriz usados mediante sistema de Biopilas. Trabajo de investigación (Ingeniería Ambiental). México: CHIAPAS, Programa de Ingeniería Ambiental, 2016. 42p.

ARCILLA Luisa, Análisis comparativo de la eficiencia de productos para la biorremediación de suelos contaminados con diésel (un 1202) utilizando métodos de bioestimulación y bioaumentación a escala piloto. Trabajo de titulación (Ingeniero Ambiental y Sanitario). Bogotá: LASALLE, Programa de ingeniería ambiental y sanitaria, 2015. 81p.

AUSAMA, Ahmed; *et al.* Biodegradation of Crude Oil in Contaminated Water by Local Isolates of *E. cloacae*: *Iraqi Journal of Science*. Vol 55, pp: 1025-1033. 2014.

BRENNER, Don; *et al.* *Enterobacter gergoviae* sp. nov.: a New Species of *Enterobacteriaceae* Found in Clinical Specimens and the Environment: *International Journal Of Systematic Bacteriology*. Vol 30, N° 1. 1980. 2p.

BUENDÍA, Hildebrando. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante compost de aserrín y estiércoles. Trabajo de Titulación (geografía mención: Ordenamiento y Gestión Ambiental) Lima: UNASAM, Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica Y Geográfica. 2013. 54 P.

DEBAJIT, Borah. Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain. India: El Servier, 2017. 181-188.

FLORES Fernando, Efecto de las condiciones de fermentación sobre la producción de exopolisacárido por una cepa nativa de *Enterobacter cloacae*. Trabajo de Tittulación (Maestro en Ciencias, Microbiología Industrial) UANL, Facultad de Ciencias Químicas, 2004.

HERNÁNDEZ Nancy, Establecimiento de un proceso de biorremediación usando *Stenotrophomonas maltophilia*. Trabajo de Titulación (Maestro en Ciencias del Ambiente). Tuxpan: UV, Departamento de Química Biológica, 2016. 45p.

HUITRÓN Benjamín, Evolución del proceso de hidrosulfuración por el manejo de tipo de crudo. Trabajo de titulación (Ingeniero Químico) México: UNAM, Facultad de Estudios Superiores ZaragozaM, 2013. 12-15 p.

IZQUIERDO Andrés, Biodegradación de HAP's durante la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de población bacteriana y genes funcionales. Trabajo de Titulación (Doctor en Microbiología ambiental y biotecnología). Barcelona: UB, Escuela de Microbiología, 2013. 202 p.

LUCAS, Ruberto, *et al.* Effectiveness of the natural bacterial flora. Biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *Internat. Biodeter. Biodegr.*, 52: 115-125. 2003.

LUJAN, Rocio y Jhoadan. Pruebas Bioquímicas para *Enterobacterias*. [en línea], 2014. [Fecha de consulta: 28 noviembre 2018] Disponibles en: <https://es.slideshare.net/SusanaGG/pruebas-bioquimicas>.

MALLMA Anali, Biorremediación microbiana de suelos contaminados con hidrocarburos mediante la bacteria pseudomona aeruginosa en la estación de servicio El Puneño del distrito de Lircay, trabajo de titulación (título profesional de licenciada de: quimico farmacéutico) Perú escuela académico profesional de farmacia y bioquímica, 2016. 96p

NILANJANA, Das y PREETHY, Chandran. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. India: Igor Kovalchuk, 2010. 13.

OTINIANO, Nélica. “Biorremediación: Aplicaciones para el cuidado sustentable del ambiente”. En: VIII congreso internacional de investigación científica denominada Tecnología e Innovación para el desarrollo. (18 de septiembre de 2017), Chimbote, 2017. p. 14-15.

PURISACA, Davis y QUEVEDO, Héctor. Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por Actinobacterias nativas de la provincia de Talara, región

Piura. Trabajo de Titulación (Licenciado en Biología-Microbiología - Parasitología). Lambayeque: UNPRG, Facultad De Ciencias Biológicas. 2015. 87 P.

PRADO, Martínez. Remoción de hidrocarburos de petróleo de un suelo de baja permeabilidad: biorremediación y electrorremediación. Rev Mexicana de Ingeniería Química. Vol 16, N° 3, ISSN: 1665 2738. México 2017.

QOMARUDIN, Helmy y RUDY Laksmono. Bioremediation of aged petroleum oil contaminated Soil: from laboratory Scale to full scale application. India: El Servier, 2014. 326-333.

RADA, Jaime. 2016 Un patógeno actual, Bolivia – Rev Soc Bol Ped. [en línea]. [fecha de consulta 10 mayo 2018].

RAMIREZ, Segura. Eficiencia de cepas bacterianas aisladas del manglar para biorremediar suelos contaminados con petróleo. Rev Quimica Viva. Numero 1 – 2016.

SAMANEZ, Elizabeth. Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo. Trabajo de titulación (Magíster en Biotecnología) Lima: UNASAM, Facultad De Farmacia y Bioquímica. 2013. 33 P.

TORRES Katerine y ZULUAGA Tatianan. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: Trabajo de Titulación (Ingeniería Química). Medellín, Escuela de ingeniería química, 2009. 37 p.

VAN, Jonathan, *et al.* Recent advances in petroleum microbiology: Microbiol Mol Biol Rev, 67 (4): 503–549. 2003.

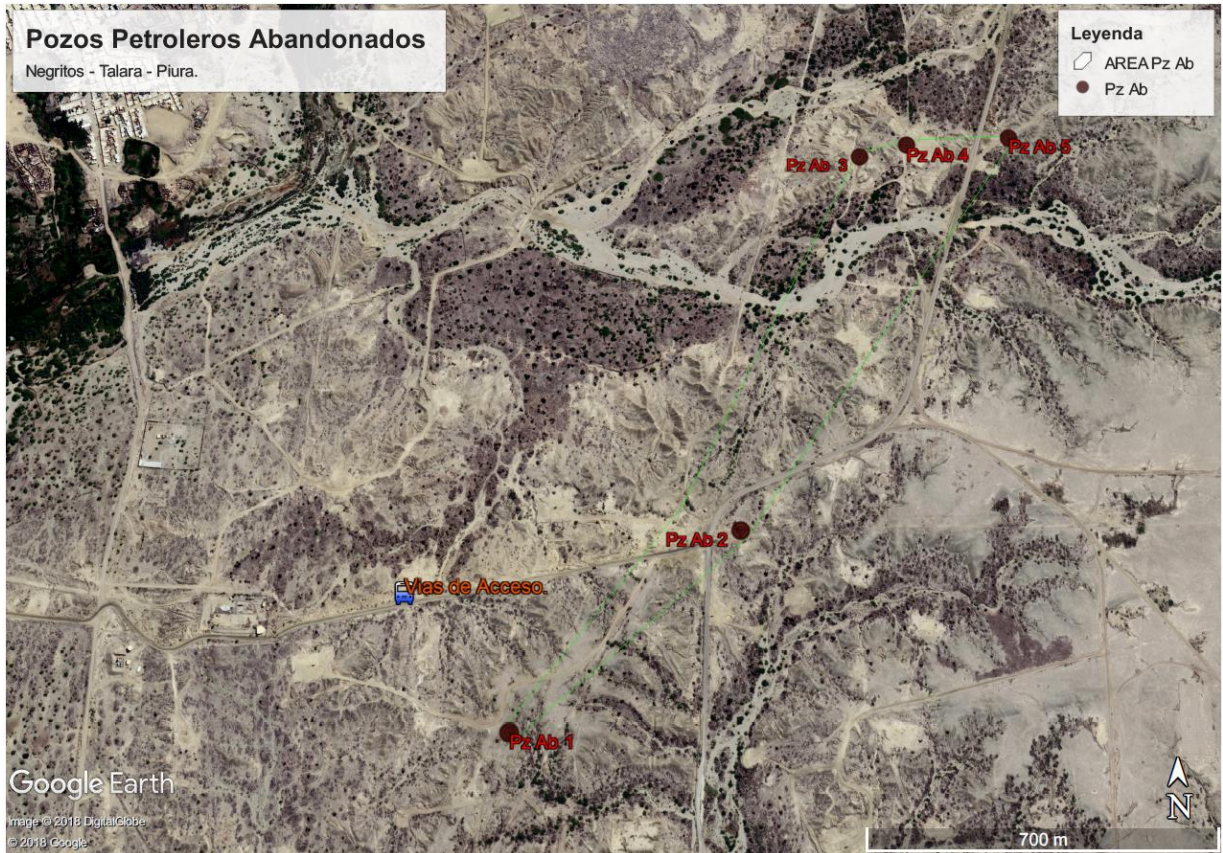
VIVANCO, Luis. Degradación de petróleo en suelos contaminados con borra de la refinería talara utilizando microorganismos autóctonos y compost. Trabajo de titulación (Biólogo-Microbiólogo). Trujillo: UNT, Escuela de microbiología y parasitología, 2013. 18 p.

YAYA, Leslie. Biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo por bacterias nativas sometidas a distintas condiciones de cultivo aplicados en aguas residuales. Trabajo de titulación (Ingeniera ambiental). Lima: UCV, Escuela de ingeniería ambiental, 2017. 49-57 P.



## VIII. ANEXOS

Figura 6: muestreo pozos abandonados



Fuente: Google Earth 2018

Figura 7: Pesado de muestra de suelo contaminado con petróleo en BHI.



Figura 8: Incubación de la muestra.





Figura 9: Crecimiento de bacterias en cultivo BHI.

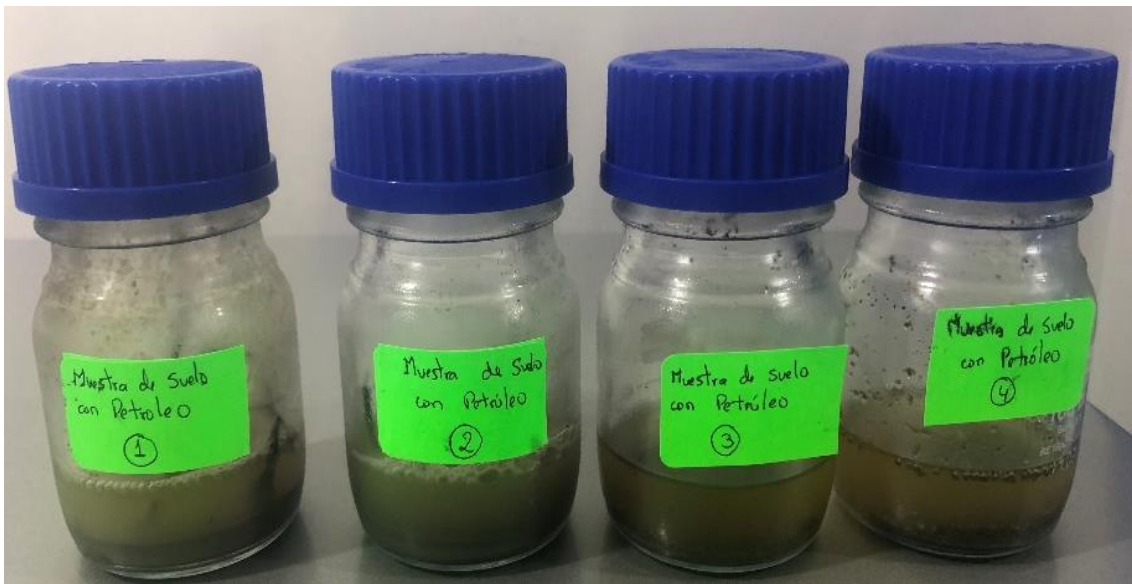


Figura 10: Crecimiento de colonias características en Agar MacConkey.

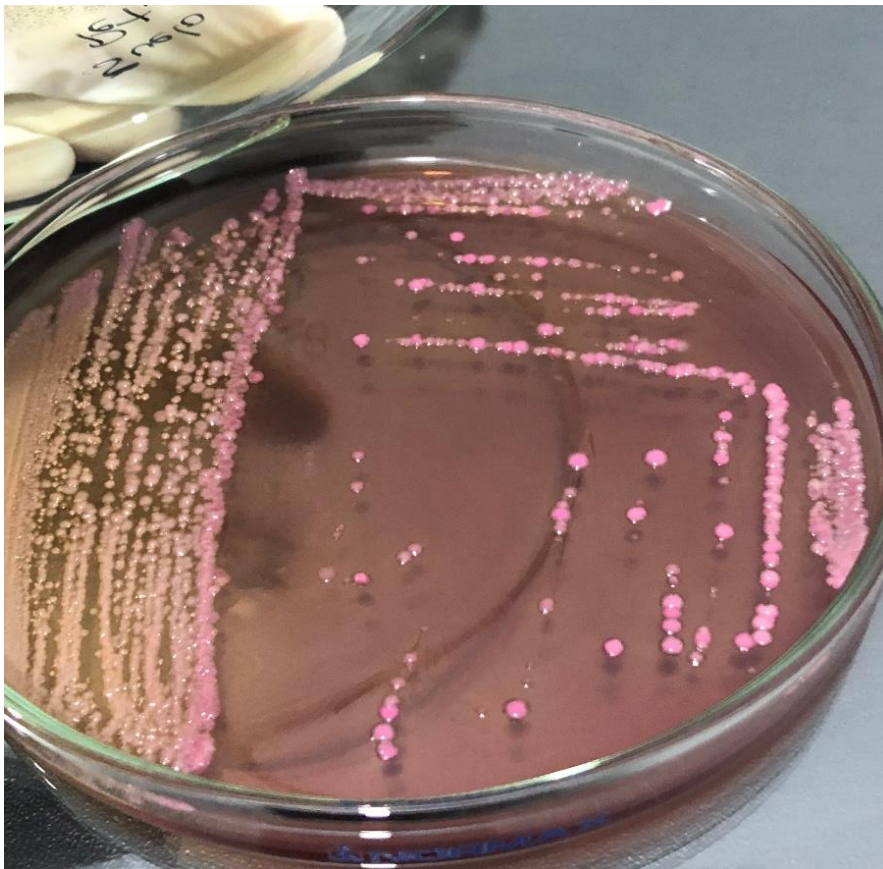


Figura 11: Observación microscópica de *E. cloacae* teñida mediante coloración Gram.

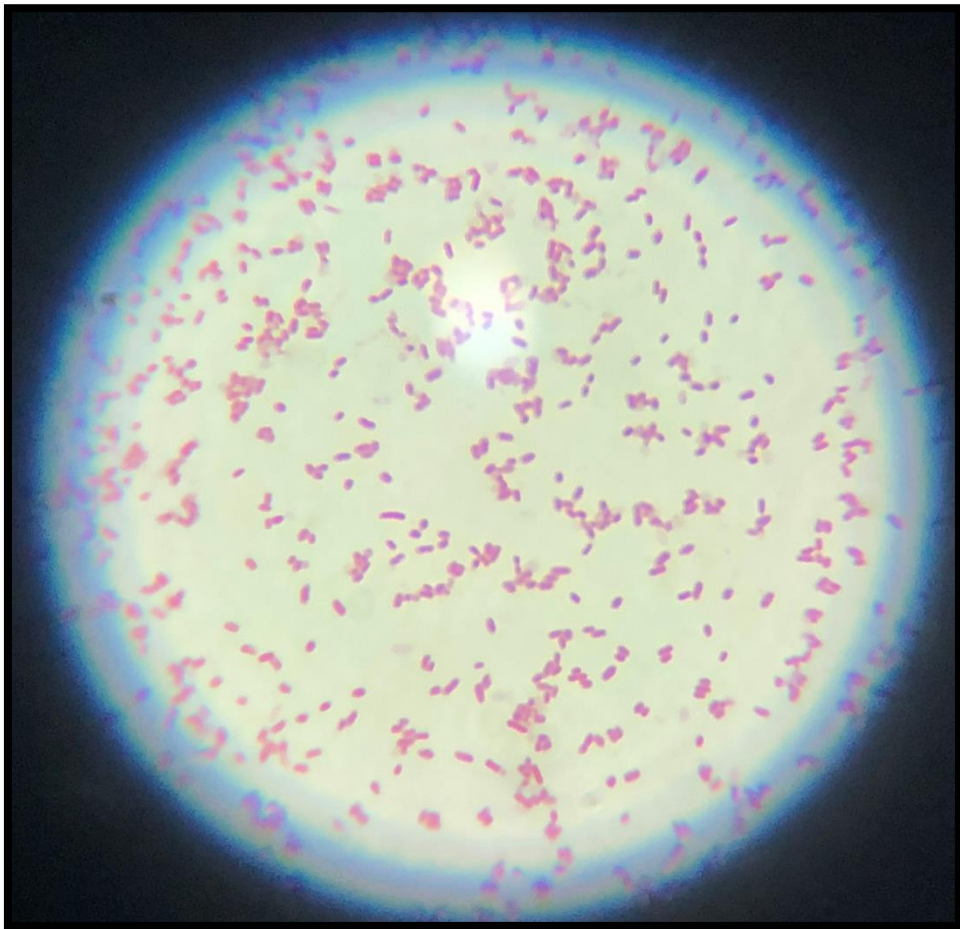
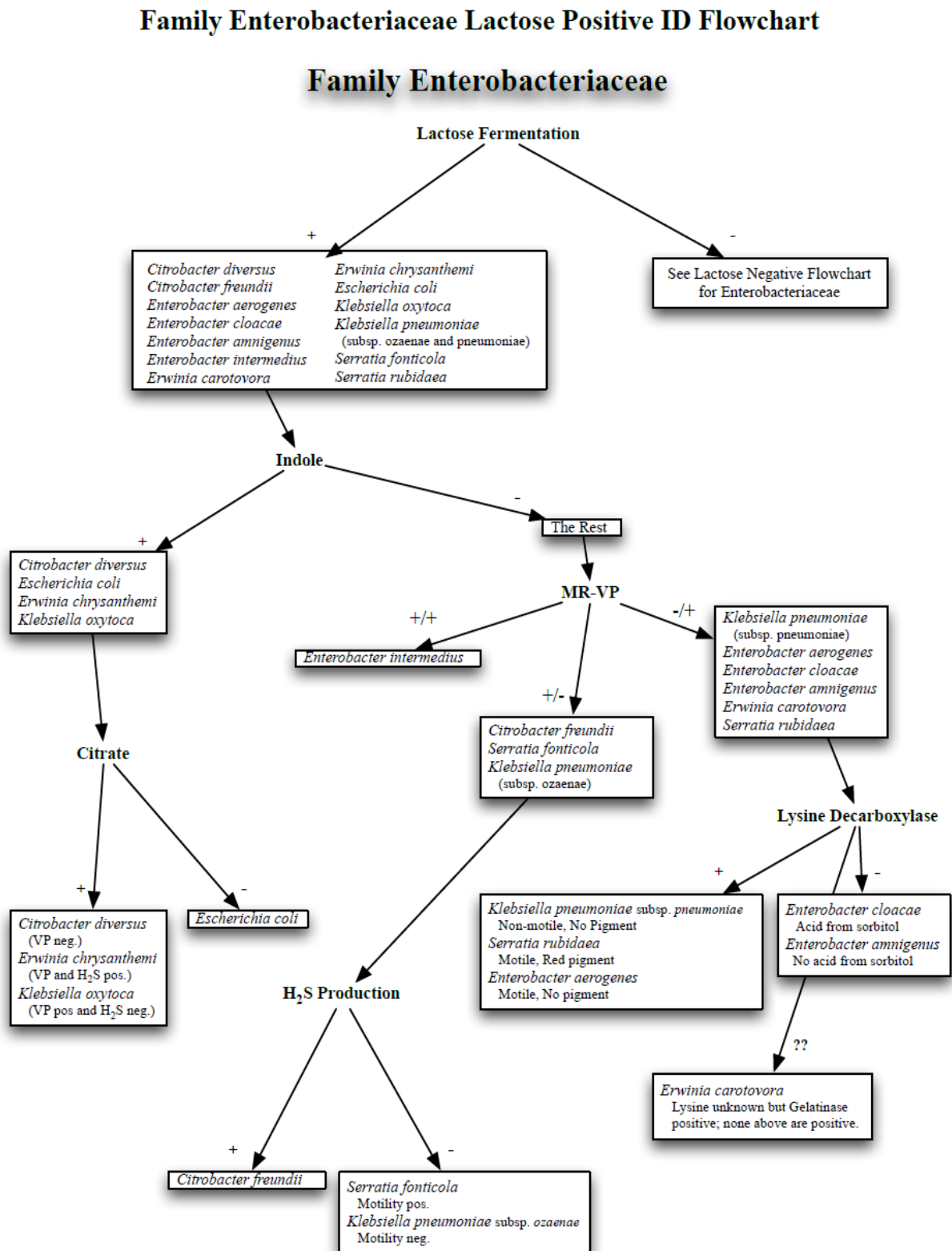


Figura 12: Pruebas metabólicas para la determinación de *E. cloacae*.



Fuente: Berge`s.

Tabla 11: Pruebas metabólicas para la determinación de *E. cloacae*.

	Indol	Citrato de Simmons	H/S TSI	Lisina descarboxilasa	Lisina deaminasa	Motilidad	Glucosa Acidez	Glucosa gas	Lactosa	Sacarosa
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Salmonella sp.</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Providencia rettgeri</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Providencia stuartii</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+

Fuente: Silva y Martínez

Figura 13: Caracterización bioquímica de *E. cloacae* antes de la siembra.

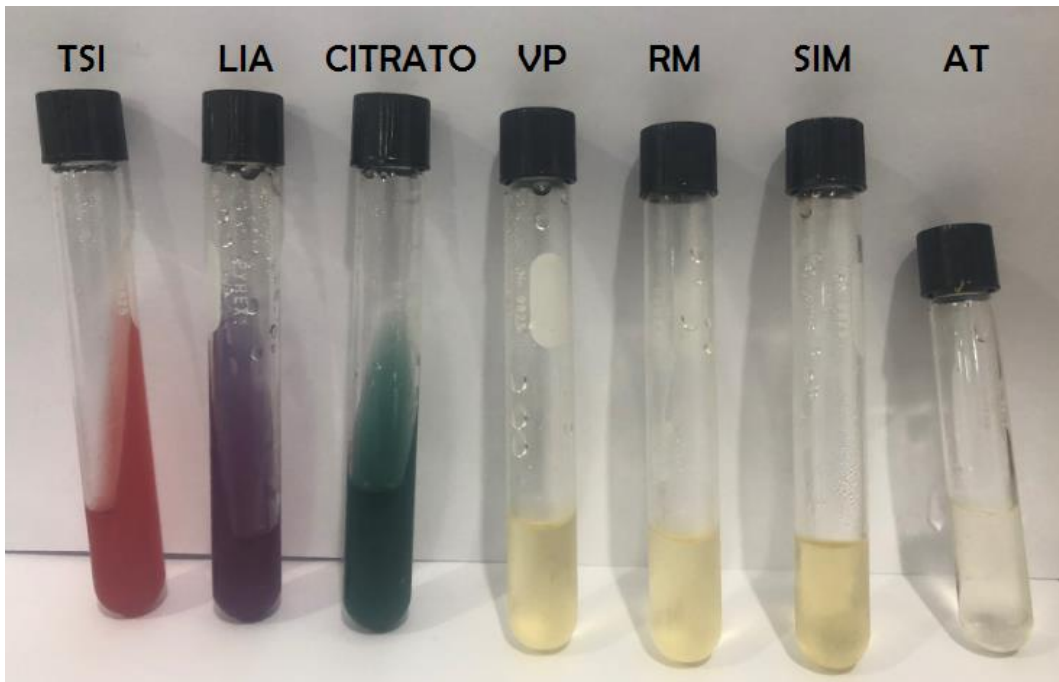


Figura 14: Caracterización bioquímica de *E. cloacae* después de la siembra.

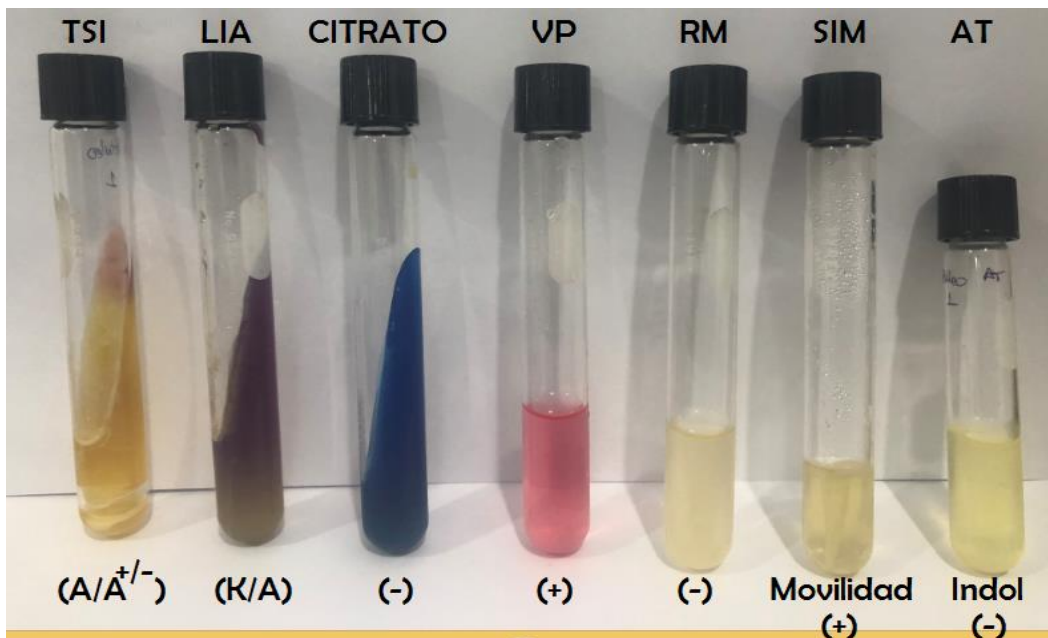




Tabla 12: Diferencias de la especies de *Enterobacter* , *Klebsiella pneumoniae*, y *Alvei*.

Test	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>H. alvei</i>
Motility	+	+	v	+	+	-	v
Lysine decarboxylase	-	+	-	-	+ or (+)	+	+
Arginine dihydrolase	+	-	-	+	-	-	v
Ornithine decarboxylase	+	+	-	+	+	-	+
Urease	v	-	v	-	+	+	-
Methyl red	-	-	v	v	-	v	v
Voges-Proskauer	+	+	v	+	+	+	v
Citrate (Simmons)	+	+	v	+	+	+	v
KCN (growth)	+	+	v	+	-	+	+
Adonitol	v	+	v	-	-	v	-
<i>i</i> -Inositol	v	+	v	v	-	+	-
<i>D</i> -Sorbitol	+	+	v	-	-	+	-
Mucate	v	+	v	-	-	+	-
Deoxyribonuclease 25°C	-	-	-	+ or (+)	-	-	-
Yellow pigment	-	-	v	+	-	-	-
G+C (%)	53	54-56	52-58	56-60	60	54-56	48-52

<sup>a</sup> Reactions were obtained at 36 ± 1°C (except for deoxyribonuclease, 25°C). The positive urease activity in *E. gergoviae* and *K. pneumoniae* is significantly weaker than that seen typically in species of *Proteus* and *Yersinia*. +, 90% or more positive within 48 h; (+), delayed positive, 3 to 7 days; -, 0 to 9.9% positive within 48 h; v, variable, 10.0 to 89.9% positive within 48 h.

Fuente: Brenner *et al.* 1980



Figura 15: Homogenización de suelo contaminado con petróleo.



Figura 16: Tamizado de la muestra de suelo con un tamiz N° 20.



Figura 17: Esterilización del suelo homogenizado en una estufa a 150°.



Figura 18: Esterilización con alcohol de 96° a los depósitos para eliminación de microorganismos.



Figura 19: Esterilización de material con rayos UV para la eliminación de carga microbiana.



Figura 20: Pesado de la muestra de suelo previa al análisis





Figura 21: Los caldos de *E. cloacae* en las dos concentraciones.(T1 y T2).



Figura 22: Aplicación del caldo de *E. cloacae* con sus respectivas concentraciones en el suelo contaminado.



Figura 23: Peso de la muestra de suelo antes del análisis de TPH.

Figura 23: Peso de la muestra de suelo antes del análisis de TPH.



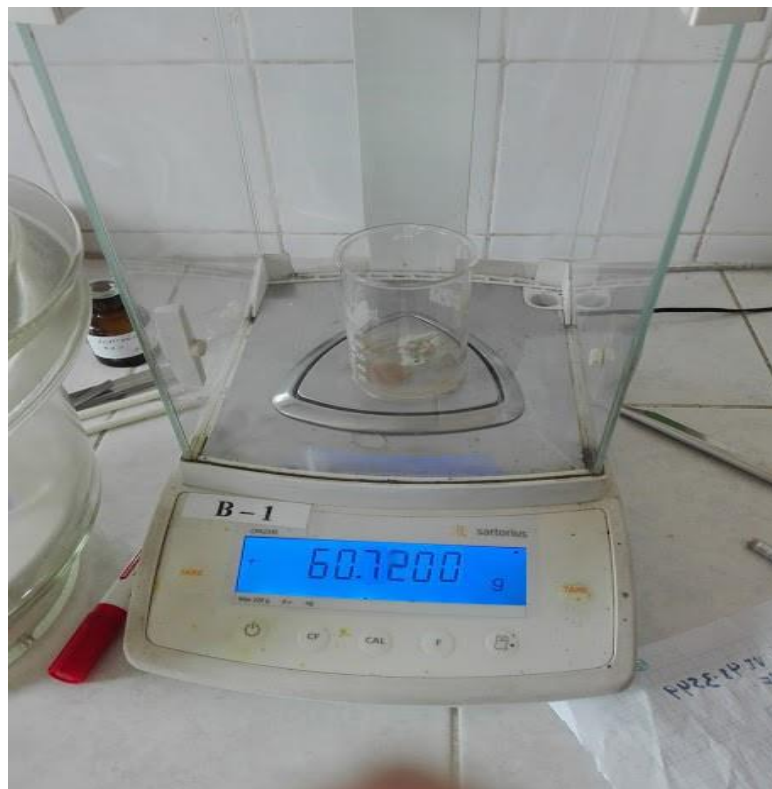
Figura 24: Aplicación del Método de Soxhlet, Extracción de grasas y aceites.



Figura 25: Las muestras en la estufa a una temperatura de 60°C para la evaporación del Ether de petróleo.



Figura 26: Peso del Vaso de precipitación más la cantidad de petróleo.



## TIEMPO 0 – 0 DÍAS

Tabla 13: Datos de la muestra testigo

<b>MUESTRA TESTIGO</b>	
<b>Peso de muestra (gr)</b>	5
<b>vaso vacío (gr)</b>	48.2549
<b>vaso + grasa (gr)</b>	48.6165
<b>grasa (gr)</b>	0.3616
<b>TPH (mg/Kg)</b>	72.26

Fuente: Propia

## **CONCENTRACIÓN DE *ENTEROBACTER CLOACAE***

En las siguientes tablas se muestran los análisis de resultados corresponden a la concentración de la bacteria en  $14 \times 10^6$  UFC/ml y  $14 \times 10^{10}$  UFC/ml, estos resultados se analizaron en el laboratorio de química de la Universidad Nacional de Trujillo, a través de método de Soxhlet, por el método de extracción de grasas.

## TIEMPO 1 – 10 DÍAS

Tabla 14: Resultados a los 10 días, análisis de concentración de *E. cloacae*  $14 \times 10^6$  UFC/ml.

	<b><i>Enterobacter Clocae</i>: <math>14 \times 10^6</math> UFC/ml.</b>		
	<b>M 1.1</b>	<b>M 1.2</b>	<b>M 1.3</b>
peso de muestra (gr)	5.00	5.00	5.00
vaso vacío (gr)	51.40	53.01	52.38
vaso + grasa (gr)	51.72	53.31	52.67
TPH (mg/Kg)	65.12	58.88	58.90
	<b>Promedio</b>		60.97

Tabla 15: Resultados a los 10 días, análisis de concentración de *E. cloacae*  $14 \times 10^{10}$  UFC/ml.

<b><i>Enterobacter Clocae: 14 x 10<sup>10</sup> UFC/ml.</i></b>			
	<b>M 2.1</b>	<b>M 2.2</b>	<b>M 2.3</b>
peso de muestra (gr)	5.00	5.00	5.00
vaso vacio (gr)	68.10	48.36	51.40
vaso + grasa (gr)	68.38	48.66	51.68
TPH (mg/Kg)	56.76	60.7200	56.78
<b>Promedio</b>			58.09

## **TIEMPO 2 – 20 DÍAS**

Tabla 16: Resultados a los 20 días, análisis de concentración de *E. cloacae*  $14 \times 10^6$  UFC/ml.

<b><i>Enterobacter Clocae: 14 x 10<sup>6</sup> UFC/ml.</i></b>			
	<b>M1.1</b>	<b>M1.2</b>	<b>M1.3</b>
peso de muestra (gr)	5.00	5.00	5.00
vaso vacio (gr)	44.99	47.77	43.82
vaso + grasa (gr)	45.24	48.02	44.05
TPH (mg/Kg)	50.06	49.62	47.02
<b>Promedio</b>			48.90

Tabla 17: Resultados a los 20 días, análisis de concentración de *E. cloacae*  $14 \times 10^{10}$  UFC/ml.

<b><i>Enterobacter Clocae: 14 x 10<sup>10</sup> UFC/ml.</i></b>			
	<b>M2.1</b>	<b>M2.2</b>	<b>M2.3</b>
peso de muestra (gr)	5.00	5.00	5.00
vaso vacio (gr)	48.03	43.37	47.40
vaso + grasa (gr)	48.25	43.59	47.61
TPH (mg/Kg)	42.56	42.92	42.84
<b>Promedio</b>			42.77



## TIEMPO 2 – 30 DÍAS

Tabla 18: Resultados a los 30 días, análisis de concentración de *E. cloacae*  $14 \times 10^6$  UFC/ml.

<b>Enterobacter Cloacae: <math>14 \times 10^6</math> UFC/ml.</b>			
	<b>M 1.1</b>	<b>M 1.2</b>	<b>M 1.3</b>
peso de muestra (gr)	5.00	5.00	5.00
vaso vacio (gr)	48.46	30.76	48.91
vaso + grasa (gr)	48.64	30.94	49.07
TPH (mg/Kg)	36.54	36.32	31.18
<b>Promedio</b>			<b>34.68</b>

Tabla 19: Resultados a los 30 días, análisis de concentración de *E. cloacae*  $14 \times 10^{10}$  UFC/ml.

<b>Enterobacter Cloacae: <math>14 \times 10^{10}</math> UFC/ml.</b>			
	<b>M2.1</b>	<b>M2.2</b>	<b>M2.3</b>
peso de muestra (gr)	5.00	5.00	5.00
vaso vacio (gr)	49.17	50.45	53.61
vaso + grasa (gr)	49.32	50.58	53.75
TPH (mg/Kg)	29.90	24.36	29.00
<b>Promedio</b>			<b>27.75</b>

## EFICIENCIA DE *E. cloacae*

Tabla 20: Eficiencia de *E. cloacae* en tiempo 1 (10 días).

Eficiencia de <i>E. cloacae</i> en 10 días				
Tratamientos	Repeticiones	Gramos de petroleo	% eficiencia	% del promedio de eficiencia
Blanco	T0	72.26	---	---
$14 \times 10^6$	R1	65.12	9.88	15.63

	R2	58.88	18.52	
	R3	58.90	18.49	
14*10 <sup>10</sup>	R1	56.76	21.45	19.62
	R2	60.72	15.97	
	R3	56.78	21.42	

Tabla 21: Eficiencia de *E. cloacae* en tiempo 2 (20 días).

Eficiencia de <i>E. cloacae</i> en 20 días				
Tratamientos	Repeticiones	Gramos de petroleo	% eficiencia	% del promedio de eficiencia
Blanco	T0	72.26	---	---
14*10 <sup>6</sup>	R1	50.06	30.72	32.33
	R2	49.62	31.33	
	R3	47.02	34.93	
14*10 <sup>10</sup>	R1	42.56	41.10	40.81
	R2	42.92	40.60	
	R3	42.84	40.71	

Tabla 22: Eficiencia de *E. cloacae* en tiempo 3(30 días).

Eficiencia de <i>E. cloacae</i> en 30 días				
Tratamientos	Repeticiones	Gramos de petroleo	% eficiencia	% del promedio de eficiencia
Blanco	T0	72.26	---	---
14*10 <sup>6</sup>	R1	36.54	49.43	52.01
	R2	36.32	49.74	
	R3	31.18	56.85	
14*10 <sup>10</sup>	R1	29.90	58.62	61.59

	R2	24.36	66.29
	R3	29.00	59.87

**L&M**

LABORATORIOS

**LABORATORIO LOAYZA MURAKAMI SAC**

## INFORME DE ENSAYO

T-001-H218-SÁNCHEZ

Pág. 02 de 02

Código de Laboratorio		T-001-01
Código de Cliente		TESIS-001
Ítem de ensayo		Suelo contaminado con Petróleo
Fecha de Muestreo		03/06/2018
Parámetro	Medio de Cultivo	
Fermentación de Glucosa	TSI	+
Fermentación de Lactosa	TSI	+
Fermentación de Sacarosa	TSI	+
Producción de Gas	TSI	+
Producción de H <sub>2</sub> S	TSI	-
Descarboxilación de Lisina	LIA	-
Desaminación de Lisina	LIA	-
Prueba de Citrato	CITRATO	+
Prueba de VP-RM	VP-RM	+/-
Prueba de Movilidad	SIM	+
Prueba de Indol	Agua de Triptona	-

\*La bacteria identificada corresponde *Enterobacter cloacae*.

\*El Aislamiento e Identificación se realizó utilizando la siguiente bibliografía:

- Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S. Bergey' Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition. USA: Editorial Williams & Wilkins; 1994.
- Silva F, Martínez P. Complejo *Enterobacter cloacae*. Rev Chilena Infectol. 2018; 35 (3): 297-298.