



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AMBIENTAL**

**“Pseudomonas putida Y Penicillium Sp. para la biorremediación
de suelos contaminados por hidrocarburos”**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
Ingeniera Ambiental

AUTORA:

Samame Pisfil, Iveth Simone (ORCID: 0000-0003-0607-4353)

ASESORES:

Dr. Lloclla Gonzales, Herry (ORCID: 0000-0002-0821-7621)

Mgtr. Cassana Huamán, Ingrid Aracelli (ORCID: 0000-0002-1843-5630)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Calidad y Gestión de los Recursos Naturales

CHICLAYO – PERÚ

2020

Dedicatoria

Realice esta investigación bajo la vigía de tus ojos, diciéndome cada día que yo podía, mientras pase los cinco años de estudio, porque me enseñaste a no rendirme nunca y siempre serás mi ejemplo de lucha día a día para conseguir mis propósitos aun a pesar de las piedras que encuentre en el camino y el cuerpo no pueda más.

Esto va dedicado a ti. Gracias Mamá, hasta el cielo.

Iveth Simone

Agradecimiento

Dicen que la mejor herencia que un padre puede dejar a sus hijos es la educación, pues soy testigo de que este dicho es cierto. Cuando cerraste tus ojos para ya no despertar más, mi corazón agradecía cada palabra de aliento que me diste, agradecía cada forma de hacer que despertara para terminar de cumplir tu sueño, que fue convirtiéndose en el mío. Te agradezco por que fue por ti, por quien termine enamorándome de esta carrera profesional, porque quizá no pude curar a un enfermo como tú lo hacías, pero procurare cuidar de cada plantita como una vez me dijiste. Sé que serás mi compañía eternamente. Gracias a Dios por brindarme la fortaleza para continuar a pesar de las adversidades.

A ti. por estar a mi lado siempre; ser mi apoyo, mi compañía, mi sustento y mi aliento para continuar. Gracias por estar en los momentos más difíciles y seguir ahí cuando logre uno de mis mayores sueños. A mis hermanas por su comprensión, por darme esa razón para continuar y permitirme ser su precedente. Por brindarme su confianza siempre para sobrellevar cada adversidad que en mi corta vida he aprendido a superar.

Agradezco a todo aquel que me alentó a continuar y a mis asesores por su empuje para que esta investigación tenga buenos resultados.

Gracias.

Iveth Simone

Índice de contenidos

Carátula	i
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Índice de contenidos	iv
Índice de tablas	v
Índice de figuras	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
III. METODOLOGÍA	15
3.1 Tipo y diseño de investigación	15
3.2 Variables y operacionalización	15
3.3 Población, muestra y muestreo	15
3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	15
3.5 Procedimientos	16
3.6 Métodos de análisis de datos	24
3.7 Aspectos éticos	28
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN	37
VI. CONCLUSIONES	39
VII. RECOMENDACIONES	40
REFERENCIAS	41
ANEXOS	43

Índice de tablas

Tabla 1: <i>Criterios niveles de pH</i>	16
Tabla 2: <i>Tratamiento y repeticiones</i>	26
Tabla 3: <i>Resultados del análisis de humedad</i>	29
Tabla 4: <i>Resultados para el análisis de pH</i>	30
Tabla 5: <i>Resultados para el análisis de conductividad eléctrica</i>	31
Tabla 6: <i>Resultado del análisis de HTP´S. o TPH´S</i>	32
Tabla 7: <i>Factor de humedad</i>	33
Tabla 8: <i>Concentración de HTP´s. mg/kg de s.s</i>	33
Tabla 9: <i>Tratamiento, crecimiento y viraje</i>	36

Índice de figuras

<i>Figura 1:</i> Localización de puntos de muestreo en el área de excavación irregular	27
<i>Figura 2:</i> Porcentaje de humedad	29
<i>Figura 3:</i> Gráficos de barras de pH	30
<i>Figura 4:</i> Gráfico de barras de conductividad eléctrica	31
<i>Figura 5:</i> Gráfico de barras de la concentración de HTP's en el suelo.	34
<i>Figura 6:</i> Porcentaje de concentración de HTP's en mg/Kg de s.s	34

Resumen

La contaminación de suelo por hidrocarburos es una problemática, que poco se ha visto, sin embargo ya se tiene precedente de este problema y algunas soluciones que aún se siguen estudiando, como por ejemplo la biorremediación y la técnica de bioventeo, por tal motivo la siguiente investigación está basada en ese tipo de antecedentes teniendo como objetivo la comparación de microorganismos eficientes en la degradación de hidrocarburos, arrojando porcentajes de remoción de hasta el 53% además de utilizar semillas de rabanito (*Raphanus sativus*) como muestra de fertilidad del suelo contaminado. Los microorganismos utilizados fueron *Pseudomonas putida* y *Penicillium Sp. (Penicillium chrysogenum)*, el experimento se desarrolló en 4 tratamientos (muestra control, *Pseudomonas putida*, *Penicillium Sp.* y consorcio microbiano) y cada uno tuvo 3 repeticiones, el tiempo aproximado fue de 3 meses desde la fase de muestreo hasta la fase de invernadero. Se analizaron parámetros como pH, conductividad eléctrica, humedad y el parámetro relevante TPH's el cual me dio resultados representativos en mg de TPH's/kg de suelo seco y de este mismo procedimiento se saca el porcentaje de remoción.

Palabras Clave: Biorremediación, microorganismos eficientes, *Pseudomonas putida*, *Penicillium Sp.*, *Penicillium Chrysogenum* Y TPH's.

Abstract

The contamination of soil by hydrocarbons is a problem, that little has been seen, however there is already a presedente of this problem and some solutions that are still being studied, such as bioremediation and bioventing technique, for this reason the following The research is based on this type of background, with the objective of comparing efficient microorganisms in the degradation of hydrocarbons, yielding removal percentages of up to 53%, in addition to using seeds of radish (*Raphanus sativus*) as a sample of soil fertility.

The microorganisms used were *Pseudomonas putida* and *Penicillium sp.* (*Penicillium Chrysogenum*), the experiment was developed in 4 treatments (control sample, *Pseudomonas putida*, *Penicillium sp*, and microbial consortium) and each had 3 replications, the approximate time was 3 months from the sampling phase to the greenhouse phase. Parameters such as pH, electrical conductivity, humidity and the relevant parameter TPH's were analyzed, which gave me representative results in mg of TPH's / kg of dry soil and from this same procedure the percentage of removal is obtained.

Keywords: Bioremediation, efficient microorganisms, *Pseudomonas putida*, *Penicillium sp*, *Penicillium Chrysogenum* and TPH's

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos por hidrocarburos es una problemática en la cual muy poco se trabaja y se habla, aun habiendo diferentes técnicas de remoción, por ejemplo, la Biorremediación,

Este tipo de contaminación se da por diferentes factores, tales como accidentes en el transporte de los cilindros que contiene este insumo, fugas en las tuberías por donde circula diferentes tipos de hidrocarburos, y sobre todo el derrame de petróleo, efectos que tienen como consecuencia los daños a ecosistemas acuáticos, terrestres y muchas veces aéreos, si bien es cierto esta problemática no se ve mucho en la costa, pero si observamos nuestro alrededor esta idea no es la adecuada, por ejemplo el olor que se genera cuando hay la combustión del petróleo, el derrame de petróleo en el trasvase en los grifos informales, en los talleres se aprecia el aceite quemado cuando se renueva el insumo, etc.

La investigación que se presenta no solo se trata de mostrar algún tipo de técnica para remediar esta problemática, sino de dar a conocer el manejo de los microorganismos en este caso la *Pseudomona putida* y *Penicillium* sp. Así se muestra que el problema de contaminación por petróleo se puede controlar y hacer de un suelo dañado o infértil a causa de este tipo de contaminación, a uno útil para cultivos de tallo alto o un posible suelo que sirva para sembrar flores o plantas ornamentales.

El método usado es la biorremediación con la técnica de bioventeo, esta técnica permite tener un suelo expuesto al ambiente y hacer pruebas de germinación.

El tiempo aproximado que toma hacer esta investigación fue de 3 meses, obteniendo en el camino resultados previos antes de culminar el estudio por completo, de esta manera la metodología adoptada fue rindiendo sus primeros indicios de factibilidad de resultados

El objetivo general de esta investigación fue la de comparar la eficiencia de *Pseudomona Putida* Y *Penicillium Sp* en el proceso de biorremediación de suelos afectados por hidrocarburos. Los objetivos específicos fueron: Identificar cepas de *Pseudomona Putida* y *Penicillium Sp* para la aplicación el proceso de biorremediación de suelos afectados por hidrocarburos. Monitorear a través de parámetros fisicoquímicos el proceso de biorremediación de suelos afectados por hidrocarburos y determinar la eficiencia de la *Pseudomona Putida* y *Penicillium Sp* en el proceso de biorremediación de suelos afectados por hidrocarburos. La hipótesis planteada fue: La *Pseudomona Putida* biorremediar el suelo contaminado con hidrocarburos.

II. MARCO TEÓRICO

La contaminación de un suelo por hidrocarburo, ya sea petróleo crudo o procesado, cuando se genera de forma accidental o por falta de seguridad en su manipulación, tiene como consecuencia los diferentes problemas de fertilidad.

En el distrito de Reque se encuentra ubicado el grifo llamado “El chofer” ubicado en el sector Diego Ferre y Villa el Sol, el distrito en mención no es ajeno a este tipo de contaminación debido a que este valle pasa por la carretera panamericana norte, el transporte pesado (camiones de carga) son aspectos que impactaran al suelo agrícola, su uso es en establecimientos que expenden diferentes tipos de hidrocarburos, ya antes mencionados; como sabemos el petróleo es un hidrocarburo muy denso que al derramarse detiene el paso de la luz, obteniendo un suelo degradado, alterando a la vez los nutrientes naturales que este posee, haciéndolo inutilizables durante años.

Las bacterias y los hongos son un tipo de medidas que se usan para la biorremediación, pero también se han empleado otros microorganismos tales como algas, cianobacterias entre otros, debido a que algunas especies degradan el compuesto tóxico.

Esto se logrará a través de la técnica de biorremediación con *Pseudomona Putida* y *Penicillium Sp.* De esta manera se logrará obtener datos significativos para que el suelo sea útil y fértil para ser usado ya sea de forma agrícola, u ornamental, etc.

PARDO et al. Colombia (2004) Manifiesta que la “contaminación de ecosistemas terrestres” se da principalmente por accidentes como derrames básicamente el petróleo. También indica que hay diferentes métodos o tratamientos para hacer de un suelo contaminado uno fértil, la técnica usada es la biolobranza (landfarming) en el cual adicionan nutrientes orgánicos.

En la siguiente investigación se evalúa dicha técnica (in vitro) se usó un diseño experimental en el cual se dividieron en repeticiones experimentaciones las cuales fueron 6 unidades de investigación en las cuales se usó petróleo crudo como fuente de energía, las unidades de experimentación se trataron con un “fertilizante

inorgánico (triple 15)” y las otros fueron un usadas como control la técnica (biolabranza) se halló analizando pH, humedad (%) y temperatura, se adiciono conteos como lo de microorganismo que son heterótrofos totales y (NMP) “número más probable de microorganismos” que degradan petróleo, metabolicen nutrientes y por último se determinó los hidrocarburos totales, el periodo de experimentación duro 4 meses.

Se lograron porcentajes donde la remoción fue alta de (Hidrocarburos totales de petróleo) en la prueba de TPH's, obtuvo un 91%, el cual llego a alcanzar una concentración final de 2028 ppm en relación al TPH, el cual fue comparado con el control biótico aquí se encontraron porcentajes de remoción de aproximadamente 65% y una concentración finales de 8049 ppm en la prueba de TPH's; como consecuencia se logró dar a conocer que mientras se sumen más nutrientes, estos optimizaran el proceso por el cual se degrade el petróleo u otros tipos de hidrocarburos en la tierra.

BRACHO et al. Venezuela (2004), Hace referencia que los hidrocarburos aromáticos son más complejos de remover del suelo, algunos de los más estudiados son el naftaleno, tolueno, antraceno, fenantreno, etc. Este tipo de hidrocarburos son liberados al ambiente debido a los diferentes procesos, tales como la quema de combustibles fósiles y sobre todo por el derrame accidental de petróleo contaminando fuentes de agua y suelo, ocasionando de manera significativa las contaminaciones el ecosistema.

En la siguiente investigación de determino de forma cualitativa el potencial de biodegradación que presentan algunas bacterias que fueron aisladas de suelos contaminados con petróleo. Esto además con la finalidad de obtener gran variedad de cepas bacterianas que tengan la capacidad degradadora de hidrocarburos presentes de suelos.

En el siguiente experimento se trabajó con 14 cepas de *Pseudomonas* sp. En total, las cuales fueron aisladas de muestras de suelo cuyo contaminante era el petróleo. Estas muestras fueron obtenidas de la localidad de “La Concepción”. Las cepas se cultivaron en un medio selectivo a fin de bioaumentar las cepas capaces de degradar los compuestos de interés. Estas se incubaron en fiolas de 125 mL

conteniendo 50 mL de medio mínimo mineral (MMM), y como fuente de carbono se emplearon los hidrocarburos aromáticos ya antes mencionados (naftaleno, antraceno, fenantreno y DBT al 0,05% p/v.) Se empleó la técnica de Kiyohara y Nagao con algunas modificaciones.

Las placas se incubaron después de la inoculación, este proceso duro toda la noche con la finalidad de eliminar el solvente por el proceso de evaporación. En el inóculo se utilizó el cultivo de cada cepa aislada las cuales obtenían una densidad óptica a la del tubo N° 2 del nefelómetro de Mc Farland, fueron observadas periódicamente durante 15 días a través de un transiluminador UVPRO CHROMATO-VUE modelo TM-36, para de esta manera determinar que la fluorescencia propia del hidrocarburo desaparezca, evidenciando zonas claras alrededor de las colonias, indicando así la capacidad que posee la bacteria en degradar hidrocarburos

El resultado de las cepas sobre los hidrocarburos se observa que las cepas estudiadas el porcentaje de degradación de hidrocarburos fue del 100% aromáticos policíclicos naftaleno y antraceno, mientras que el 78,57% degradó el fenantreno. En relación a la fracción de heterocíclicos azufrados estudiada representada por el DBT, este fue degradado sólo por el 71,42% de las cepas aisladas.

MARTÍNEZ et al, México. (2011), Utilizo como método de biorremediación en fase aerobia lodos residuales (biosólidos) que provenían de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de origen doméstico, el suelo fue contaminado accidentalmente por derrames de diésel, aceites y grasas, esta problemática tenía como ubicación la Minera San Antonio que pertenecía al grupo Goldcorp México, del Municipio de San Dimas, en la ciudad de Durango.

Los experimentos se realizaron en laboratorio y se utilizó además como piloto, los análisis fueron ajustados teniendo al carbono y nitrógeno (C: N) = 10:1, en estos parámetros se evaluó la adición de nutrientes, el material a remediar y su efecto, el tamaño de partícula y si influencia en la degradación. De esta manera se mostró que los charcos residuales son aptos para la estimulación de microorganismos originarios de los suelos, estos además se encargaron de remover hidrocarburos, el cual fue empleado como fuente de carbono

De tal forma la muestra de suelo en experimentación alcanzo una remediación aeróbica el cual se encontraba dentro del “límite máximo permisible (LMP) establecido en la normatividad mexicana vigente (NOM–138–SEMARNAT/SS–2003)”

BENAVIDES et al, Colombia. (2006), El transporte de crudo y sus derivados son efectos que en Colombia se viene dando, el cual afecta de manera significativa durante los últimos 18 años, esto debido a la mala disposición de oleoductos y de las instalaciones petroleras. De tal afecto el derrame que se propicio tiene efectos negativos de carácter económico social.

Debido a este problema de derrame de petróleo crudo se analizó la biorremediación como un tipo de alternativa más saludable, se aplicó este método en in situ teniendo como muestra suelos contaminados con este tipo de hidrocarburos (aceite, diésel) y se realizó a través de nutrientes y la bioestimulación de nutrientes, además de una inoculación de consorcio microbianos que previamente fueron extraídas del mismo suelo (bioaumentacion), este proceso se maneja para encontrar consorcios bacterianos capaces de degradar hidrocarburos; estos consorcios fueron identificadas por secuenciación de genes 16S-RNA, identificando que existe la presencia de *Bacillus sphaericus*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus fusiformis*, *Acinetobacter junii*, y *Pseudomonas sp.*

Una de las bacterias que tiene una gran capacidad de metabolizar hidrocarburos, dando lugar al desarrollo de crecimiento de la planta. La *Pseudomona putida* degrada alcanos y se ha estudiado otros tipos de microorganismos como *Nocardiodes sp.* y *Acinetobacter* que también metabolizan componentes de los hidrocarburos.

TORRES y ZULUAGA, (2009), El petróleo es el producto que se obtiene a partir de la degradación de materia orgánica de forma anaeróbica, teniendo condiciones tales como el tiempo la temperatura y la presión, convirtiéndolo en gas natural, el llamado petróleo crudo y los diferentes tipos del petróleo. El petróleo en forma de crudo posee una adición muy compleja y diferentes de compuestos orgánicos, existen dos grupos primordiales tales como los hidrocarburos aromáticos los cuales hacen referencia a los monocíclicos, el tolueno, el benceno y xileno (BTEX) además

de los hidrocarburos de tipo policíclicos (HAPs) tales como el fenantreno, antraceno y naftaleno

Torres y Zuloaga manifiestan que para el proceso de biorremediación una de las principales causas que la constituyen es la degradación microbiana. Una matriz de contaminación es el petróleo crudo debido a que contiene gran cantidad de compuestos, por lo tanto, este producto es ideal para evaluar su potencial catabólico en consorcios microbianos o cepas que manifiesten interés en la técnica de biorremediación

La tecnología de biorremediación es utilizada por microorganismos debido a su potencial metabólico, los hongos, así como también las bacterias y levaduras son utilizados para transformar, remover o minimizar contaminantes de origen orgánico y de compuestos simples y es así como se puede utilizar para descontaminar aguas y terrenos contaminados.

Los hidrocarburos y otros compuestos son transformados y metabolizados aeróbicamente por microorganismos, así el proceso de biorremediación ocurre naturalmente. Es rescatable que los microorganismos autóctonos aislados tienen la capacidad de adherirse y adaptarse a la degradación de cualquier tipo de compuesto orgánico, pero para que este tipo de tecnología suceda requiere de condiciones ambientales como pH, temperatura además de las condiciones para humedad y conductividad eléctrica. La mano del hombre se hace presente para mejorar las condiciones para la bioaugmentación de microorganismos para degradar algunos compuestos químicos.

TRUJILLO Y RAMÍREZ, (2012), Al proceso que utiliza microorganismos vivos se le llama Biorremediación, a esta técnica se aplica también hongos y plantas, para de esta manera hacer que el ecosistema contaminado retome sus propiedades naturales.

Biorremediación de suelo: Esta técnica es eficiente cuando se trata de limpiar suelos contaminados, contrastando a alternativas que son más costosas económicamente y además que ambientalmente no están muy bien dispuestas como la incineración. Los componentes para acelerar esta técnica de

biorremediación pueden ser por la suma de nutrientes, la humedad ideal, el pH y la inoculación de microbiota. Con las variables anteriores la actividad microbológica presente, acelera procesos metabólicos y así descontaminar el ecosistema en este caso el suelo.

Métodos de biorremediación en suelos

El método para que la biorremediación se lleve a cabo depende del lugar de experimentación, por ejemplo; en escenarios In situ, se excava el terreno y se trata en el mismo lugar, o bien en escenario Ex situ el cual consta de instalar fuera del lugar de contaminación, la técnica se valora a través de distintas variables y características del contaminante que se va a tratar.

Biorremediación in situ.

Normalmente el tratamiento In situ es una de las opciones para recuperar suelos, debido a que no es necesario la excavación y la preparación de lugar contaminado, sin embargo antes de dar como tratamiento oportuno se valora factores de impacto ambiental en la zona, aparte de los costos, los accesos para proveer nutrientes y oxígeno, el tiempo y el porcentaje de remediación y por último si el contaminante pone en peligro más extensión de terreno, el bioventeo o bioaireación son una de las técnicas que se usa en este tratamiento, además de la inyectar aire a presión, aquí también encontramos la bioaumentación, bioestimulación y la atenuación natural.

Biorremediación ex situ

En este tipo de tratamiento el procedimiento se tiene la mayor disposición sobre el suelo, aquí se encuentran técnicas como bioceldas o biopilas y la fitorremediación.

Fitorremediación

Una de las técnicas de biorremediación como la fitorremediación constituye una variación de plantas o microorganismos que estén asociados a ellas, esta técnica agronómica está dirigida a liberar, retener y transformar compuestos que contaminan al suelo, la fitorremediación, gracias a investigaciones no solo trata

contaminantes inorgánicos como los metales, haluros; si no, además de contaminantes orgánicos, en las investigaciones algunas de las plantas usadas en esta técnica que se han probado con éxito en la remoción de hidrocarburos (petróleo) son:” *Panicum maximun* Jacq., *Paspalum virgatum* L., *Echinochloa polystachya* H.B.K., *Zea mays* L., *Sorghum vulgare* L., *Phaseolus coccineus* L.

Otros agentes biorremediadores *Moench. Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf., *Phaseolus vulgaris* L., *Chamaecrista nictitans* (L.), *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L.”, entre otras

Microorganismos en la biorremediación

TORRES y ZULUAGA, Colombia (2009), Para que los microorganismos se desarrollen deberían estar en un apropiado ambiente, es el suelo, aquí se encuentra una variedad de organismos eucariotas como algas, hongos y protozoos, así también organismos procariotas (arqueas y bacterias), incluso se pueden encontrar bacteriófagos y hasta virus, todos estos organismos mencionados desempeñan funciones en relación a procesos de formación y al desarrollo de suelo (edafogénesis), además de la degradación de compuestos xenobioticos, etc.

Microorganismos concretos

Los microorganismos que son aislados en suelos poseen propiedades que permiten que la oxidación de petróleo se de en algunas fracciones. Aquí la fase de oxidación se ve alterada en algunos compuestos químicos y sus propiedades, haciendo que existan ataques secundarios y facilitando su conversión para disminuir su toxicidad.

Las bacterias de género *Pseudomonas* poseen la capacidad de asimilar substratos, los cuales incluye a las sustancias del petróleo. Las bacterias como las *Pseudomonas* son Gram negativas, este género pertenece a la subclase de las Proteobacterias. Estas bacterias producen biosurfactantes. Y algunos de estos microorganismos son productores de estos; además contienen sustancias degradadoras de petróleo o de diferentes tipos de hidrocarburos. La *Pseudomonas aeruginosa*, es una las subclases de micro fauna que más se emplea debido a su estudio en el proceso de biorremediación.

Otros agentes biorremediadores

TRUJILLO Y RAMÍREZ, (2012), Los animales también son agentes que actúan como biorremediadores, debido a que tienen efectos descontaminantes, y algunos poseen microorganismos que son capaces de retener metales pesados como por ejemplo la lombriz de tierra (*lumbricus terrestris*) la cual absorbe contaminantes acumulándolos en las vías digestivas y en los tejidos.

La Contaminación con hidrocarburos

DIAS, (2011), El crecimiento de las ciudades y la gran industrialización son efectos que causan una amenaza para el ambiente, lo cual muestra como resultado una acumulación de contaminantes químicos, que se impregnan especialmente en el suelo; como ejemplo, estados unidos tiene una producción entre 5-20 millones de toneladas métricas de propileno, etileno, benceno, etc. y alrededor de 1-5 millones de toneladas de diferentes productos químicos de origen orgánico.

Además, en todo el mundo aproximadamente se producen 140 millones de toneladas de polímeros sintéticos. El 1 % del crudo que se produce mundialmente y es ingresado al ambiente ya sea por derrames, eliminación de residuos o volatilización, esta contaminación equivale anualmente a 266 millones de barriles.

Suelos contaminados con hidrocarburos

La extracción, el procesamiento y el transporte de los hidrocarburos son procesos en los cuales el suelo se encuentra continuamente expuesto a accidentes como los derrames. Cuando este tipo de accidentes sucede el suelo tiende a cambiar tanto química como biológicamente su estructura. Por ejemplo, una de las principales modificaciones es un incremento del contenido de carbono (C). Este carbono tiene una relación directa entre C: N: P.

Biológicamente los hidrocarburos tienen la facultad de estresar al suelo condicionando el desarrollo de consorcios microbianos, de tal forma que permite que las poblaciones crezcan obteniendo capacidades donde se metabolicen adecuadamente y sean fuentes de energía, en este caso el hidrocarburo (petróleo) haciéndolos más resistentes a otros.

Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos

El conjunto de operaciones que se realizan con el objetivo de disminuir, controlar y hasta eliminar contaminantes presentes en la contaminación de suelos, son tratamientos y/o técnicas de recuperación de estos.

Técnicas disponibles para eliminar hidrocarburos

Se le denomina técnica a la necesidad de reducir al mínimo (eliminar) en este caso al hidrocarburos que se convierte en contaminante debido a la mala manipulación humana, por tal motivo esto ha llevado a desarrollar estrategias, teniendo en cuenta que no solo existe un solo tipo de técnica si no que depende mucho del sistema afectado (ecosistemas acuáticos o terrestres), además de las características físicas químicas del tipo de contaminante, el tiempo y la parte económica son factores que también influyen en la elección de las técnicas de remediación.

Cuando la fuente de contaminación se da en el suelo y por derrame, es cuando se plantean diferentes alternativas, tales como la atenuación natural hasta la aplicación de tratamientos químicos o físicos. Este tipo de técnica (la atenuación natural) es llamada recuperación intrínseca o pasiva; esta es utilizada como método de recuperación en ambientes como agua y suelos contaminados y esto por su mínimo bajo costo económico, sin embargo a pesar de ser usados en diferentes lugares, es muy raro que se aplique en debido que su efecto de remoción es más lento.

“USEPA (1999)” manifiesta que, la técnica de atenuación natural trata de usar procesos que sean naturales para retener que la contaminación se extienda que proceden de los diferentes químicos que son vertidos, minimizar la concentración y la toxicidad no aumente en las zonas donde se encuentre la contaminación. Finalmente, el éxito de la técnica de “atenuación natural” estará expuesta a las características hidrológicas, geológicas y microbiológicas de la zona contaminada.

Factores que condicionan la biorremediación de un suelo

La contaminación de suelos por causa de una mezcla de hidrocarburos, depende de variados factores tal es la presencia de un consorcio microbiano que posea un efecto degradador potencial de este insumo, además se incluye factores como pH, temperatura, biodisponibilidad, concentración, humedad del suelo, etc.

El pH, temperatura y la humedad.

El rango de tolerancia está determinado por factores ambientales y la cepa, existen parámetros que afectan el crecimiento de poblaciones microbianas, tales como la temperatura, salinidad y pH. Mientras mayor es la diversidad microbiológica, existe posiblemente mayor rango de tolerancia. Por tal motivo no existe condiciones establecidas y que sean óptimas para los diferentes casos de la biorremediación, aunque generalmente el pH oscila entre 6 – 8 y la temperatura en 20 a 30 °C.

Pseudomonas Putida

Rockne K et al (2000), El género *Pseudomonas* tiene la habilidad para usar substratos, los cual incluye los creados por lo hidrocarburos. Estas bacterias son “Gram negativas, que pertenecen a la subclase de los Proteobacterias”. Bushnell y Hass fueron los primeros en explicar acerca de estas bacterias manifestando que son productoras de biosurfactantes. La *Pseudomona Putida* se encuentra en el suelo, que metabólicamente posee componentes que degradan hidrocarburos por lo tanto esta bacteria es una candidata para las aplicaciones biotecnológicas, como agricultura, biorremediación, biocontrol, biocatalisis.

Penicillium sp.

Valenzuela F, Eduardo. et al (2006), se encontraron cepas de *Penicillium* las cuales se aislaron de áreas donde existía contaminación debido a la filtración de petróleo, en el estudio se obtuvieron resultados después del octavo día, la muestra se recogió del tratamiento de donde se inoculo el hongo, manifestando una degradación de hidrocarburos aromático.

¿Qué microorganismo tendrá la capacidad de biorremediar suelos contaminados por hidrocarburos?

La contaminación de suelos por hidrocarburos en este caso de petróleo causa impactos muy graves para el suelo, haciendo de este uno infértil. El empleo de estos microorganismos como fuentes de biorremediación para ser utilizados en el tratamiento de suelos contaminación por hidrocarburos, es una opción debido a que son fáciles de adaptarse al medio en estudio. De esta manera se generará información importante para el tratamiento y gestión adecuada del recurso y los diferentes parámetros que pudieran ser alterados por los hidrocarburos.

De esta manera se aportaría a la recuperación de un suelo posiblemente contaminado y se dispondría a su uso, y no solo de uso agrícola si no pudiendo realizar parcelas o jardines para la buena visión, esto debido a que el predio se encuentra ubicado en el panamericano norte así la población también sería beneficiada.

Hipótesis

Hi: La *Pseudomona Putida* logra la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

H0: La *Pseudomona Putida* no logra la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

Objetivos:

Objetivo general

- Comparar la eficiencia De *Pseudomona Putida* Y *Penicillium Sp* en el proceso de biorremediación de suelos afectados por hidrocarburos.

Objetivos específicos

- Identificar cepas de *Pseudomona Putida* Y *Penicillium Sp* para la aplicación el proceso de biorremediación de suelos afectados por hidrocarburos.
- Monitorear atreves de parámetros fisicoquímicos el proceso de biorremediación de suelos afectados por hidrocarburos.

- Determinar la eficiencia de la *Pseudomona Putida* Y *Penicillium Sp* en el proceso de biorremediación de suelos afectados por hidrocarburos.

III. METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño de investigación

Diseño de investigación

El presente trabajo de investigación, posee un diseño cuasi – experimental.

El método cuasi experimental se presenta para estudiar problemas en los que no se puede tener total control de las situaciones, pero se trata de tener el mayor control posible.

3.2 Variables y operacionalización

Variable: Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburo

3.3 Población, muestra y muestreo

Población:

La población fue de 30 Kg. de suelo contaminado por hidrocarburos (muestra compuesta)

Muestra

La muestra fue de 7 kg. Aproximadamente, del total de muestra compuesta 6 Kg. De suelo para fase de campo (invernadero) 1 kg. De suelo para análisis previos (pH, humedad, conductividad eléctrica)

3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Técnicas:

Los datos recolectados se evaluaron a través de parámetros que serán observados, los datos obtenidos se anotarán en agenda de campo y luego en tablas digitales (como evidencia de los hechos), estos se obtendrán de acuerdo a la investigación y dentro de los laboratorios.

Instrumentos:

Se utilizo los siguientes instrumentos:

- Termómetro
- Conductímetro
- Peachímetro
- Balanza digital.
- Rotavaporador
- Materiales de Laboratorio

Validez:

Solo validación mediante el laboratorio de biotecnología de la universidad Cesar Vallejo

3.5 Procedimientos

1) Se debe Pesar 1 g de suelo (exacto) y verter el soluto en un vaso de precipitado, se agregar 10 ml de agua destilada como solvente, se dejar reposar aproximadamente 10 minutos, después de la agitación, antes se debe de regular el potenciómetro utilizando las soluciones amortiguadoras, finalmente después de los 10 minutos se midió el pH.

Criterios de evaluación

Los criterios para evaluar pH, se encuentran en: "(NOM-021-RECNAT-2000)". Son los siguientes:

Tabla 1: *Criterios niveles de pH*

Categoría	Valor de pH
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 - 6.5
Neutro	6.6 - 7.3
Medianamente alcalino	7.4 - 8.5
Fuertemente alcalino	8.5

Fuente: Manual de técnicas de análisis de suelos

1. **Humedad**

La humedad es la cantidad de agua que retiene el suelo, cuando se trata de suelo que han sido contaminados con hidrocarburos (petróleo) se dice que es difícil de rehidratar el suelo con esta característica. La medición de humedad se desarrolló en función al porcentaje que el suelo retiene de agua.

Método

El método a utilizar para la medición es el gravimétrico, así se determinará solo la cantidad de agua que existe en el suelo.

Material y equipo

Para el proceso de este método se usó 1gr. de suelo. (Antes y después) además de espátulas, balanza analítica, papel aluminio o crisoles y como equipo a la estufa.

Procedimiento

Se pesó 1 g de muestra sobre un papel aluminio o crisoles esto a peso constante, luego de ser pesado se colocará la muestra a la estufa a 80°C de temperatura de 12 a 24 horas. Esta se colocará en un desecador, esperar a que enfrié y luego tomar apuntes de los pesos. Finalmente se harán los cálculos para hallar su peso fino.

$\% \text{ Humedad del suelo} = (\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) / \text{Peso inicial} * 100$ (p. 22)

2. **Conductividad eléctrica**

Es la capacidad que posee el suelo y sus componentes para transportar corriente eléctrica la cual se expresa en categorías: “mmhos/cm o en mSiemens/m; la NOM-021-RECNAT-2000”. Para determinar la condición del suelo tenemos:

a) **Suelos salinos.**

La conductividad eléctrica tiene un valor maso menos igual o superior a mmhos/cm y una temperatura de 25°C su característica más representante es que este suelo tiene una “costra de sales blancas”, que pueden ser “sulfatos, cloruros y carbonatos de calcio, magnesio y sodio”. (p.23)

b) **Suelos sódicos.**

Este tipo de suelo posee un color negro ya que contiene un aumento de sodio. “La conductividad eléctrica está por debajo de 4 mmhos/cm a 25°C”. Y tiene un pH que oscila entre 8.5 y 10.0. (p.23)

c) **Suelos salino-sódicos.**

“Poseen una conductividad eléctrica de 4 mmhos/cm a 25°C”, y el pH es muy variable, y mayormente superior a 8.5 (p.23)

Método

Para este método se usa el conductímetro para medir la conductividad eléctrica y esto se realiza atreves de una solución de suelo y agua o un “extractor de suelo” (p. 23)

Material y equipo

Se tiene como materiales 1gr de suelo seco y que este molido, también se usó una balanza analítica y vasos de precipitados cuyo volumen sea de 100ml, el papel filtro, el agua destilada, una piceta y papel filtro son elementos que se encontraron a la realización de la medición y por el ultimo el conductímetro el cual nos mostrara el resultado.

Procedimiento:

1. Colocar la muestra en un matraz, previamente al suelo se le adiciona agua destilada y se lleva al agitador.
2. Con agua destilada previamente se lava el conductímetro, antes de colocarlo a la muestra
3. Finalmente se toma la lectura cuando el conductímetro de mesa.

3. Hidrocarburos del petróleo en suelo

Preparación de muestras de suelo para extracción

Para analizar suelos con hidrocarburos es recomendable que la muestra este seca y así molerlas para obtener así, muestras más homogéneas.

Material

- Papel aluminio.
- Espátula.
- Frascos de vidrio de 30 ml.
- Mortero.

Procedimiento

El suelo que será procesado deberá tener un peso entre 8 y 15gr, de suelo las cuales se colocaron en un papel resistente al calor "papel aluminio" ambos deben estar a una temperatura de 30°C a 48 horas a sombra controlada o mediante un equipo que pueda regular la temperatura. Para obtener particular de tamaño más fino, se deberá moler el suelo, después se colocará en un lugar fresco y que se encuentre seco (frasco).

Nota: "Aunque las muestras se ponen a secar, casi nunca se elimina completamente el agua, por lo que hay que determinar la humedad final de éstas". (p. 91)

4. Extracción agitación-centrifugación

Método

“La técnica para la extracción de los hidrocarburos del petróleo del suelo se basa en los métodos 3500B y 3540C de la US EPA (1996) y el reportado por Schwab *et al.* (1999), con algunas modificaciones en cuanto a la velocidad de agitación y volúmenes de solvente” (p. 94)

Material y equipo

Aquí se tiene en cuenta los siguientes materiales; espátulas, pipetas y tubos para centrifuga (vol. 15ml) como equipos: la centrifuga, vortex, balanza analítica y rotovaporador. En los reactivos encontramos al diclorometano (CH_2CL_2) y sulfato de sodio (Na_2SO_4)

Procedimiento

1. Se peso entre 0.5 a 2 gr. de suelo, este debe estar seco y triturado; esta muestra se coloca en el tubo para centrifuga (15ml) y se le adiciona 3gr. de sulfato de sodio (Na_2SO_4) y colocar en el vortex hasta que este homogenizado.

“Nota: el sulfato de sodio anhidro debe secarse previamente en el horno por 4 horas a 120°C.” (p.95)
2. Se agrego 5 ml de diclorometano y nuevamente se debe llevar al vortex para ser agitado, durante un tiempo aproximado de 45 segundos, así se unirán el extracto solido con el líquido (diclorometano).
3. La solución de colocar en la centrifuga a 6 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante será colocado en un vial con tapa rosca, matraz de bola o en un tubo tapado.
4. Para obtener una solución de 15 ml de “extracto orgánico” (sobrenadante) se debe lavar el residuo solido que se queda en el tubo se agita para obtener un concentrado y completar la solución con la primera solución (procedimiento 3). (p. 95)

5. El residuo que se obtiene después de ser evaporado el diclorometano del suelo (procedimiento anterior) hasta que llegue a secarse, este soluto se debe de colocar en un vial como reserva de otros procedimientos bajo el contexto de los métodos en la guía de métodos de hidrocarburos.

“Nota: Los resultados obtenidos con este método fueron comparados con el método de extracción Soxhlet de acuerdo con el método D5369-93 del ASTM (1998 y 2003), y los métodos 3540C y 3541 de la US EPA (1996 y 1994)”.
(p. 95)

5. Hidrocarburos totales del petróleo (HTPs)

Para la medición de HTPs es recomendable que, para muestras aceitosas, o para muestras de composición acuosa, el solvente preferido es el hexano (US EPA 821-B94-004, 1995). (p.100)

Material y equipo

Los materiales que se usaron fue una balanza analítica, matraces de bola con volumen de 250 ml. Pinzas, rotavaporador y tubos de vidrio de 25ml.

Procedimiento

1. El matraz de bola debe estar a peso constante y deberá contener el extracto orgánico, esto se colocará en la estufa con una temperatura de 120°C el tiempo aproximado es de 4 horas, luego se secará el recipiente y ponerlo en un desecador (esperar a que se enfríe), se pesará; El mismo procedimiento se volverá a realizar hasta que el peso no cambie, por lo tanto, deberá tener un peso constante (RA)
2. Matraz de bola deberá contener el extracto orgánico a peso constante, y esto se llevará al proceso de evaporación del solvente, esto debe ser evaporado en su totalidad (diclorometano) este proceso se realizará en el rotovaporador a una presión de 740 ± 50 mbar a una temperatura de 45°C hasta observar que este seco.
3. El matraz y el extracto libre de solvente se pesará nuevamente. Se anotará el peso (RB)

Cálculos

“La diferencia en peso corresponde al contenido total de HTPs. Para hacer el cálculo de concentración de hidrocarburos totales del petróleo provenientes de la muestra, se debe considerar la cantidad de suelo que se pesó para la extracción, así como la humedad de la muestra. El resultado debe expresarse en mg de HTP/kg de suelo seco, y se calcula de la siguiente manera:” (p 100)

$$\text{HTPs (mg kg}^{-1} \text{ de s.s.)} = (\text{RB} - \text{RA}) * (\text{FC}) / (\text{P} * \text{FH}). \text{ (p.100)}$$

Segunda fase: Prueba de toxicidad del contaminante, aislamiento e identificación de microorganismos.

1. Toxicidad del contaminante en el suelo:

Para esta prueba se esterilizaron 5 placas Petri en las cuales se colocaron 20 semillas de rabanito (*Raphanus sativus.*), junto con papel filtro y se regaron con agua estéril incendiariamente hasta llegar a la germinación completa, la cual duro un aproximado de 120 horas (5 días) a una temperatura de 28 °C. Obteniendo un 100% de germinación.

El mismo procedimiento se realizó, pero esta vez se usó al suelo contaminado, agua estéril y la misma cantidad de semillas de rabanito (*Raphanus sativus*). Del mismo modo las placas Petri se llevaron a incubar 28°C durante 120 horas (5 días).

2. Aislamiento e identificación de *Pseudomonas putida* y *Penicillium sp*

Para favorecer el crecimiento de esta bacteria y hongo, se tiene como procedimiento:

Se pesó 10g de la muestra de suelo contaminado y a continuación se enriquecieron en 90mL de caldo Bushnell Haas a 30°C durante 24 horas para la bacteria y para el hongo 4 días.

El sembrado se hizo por la técnica de agotamiento y estría sobre Agar King B y en Agar Sabouraud, después se agruparon las colonias de acuerdo a sus características morfológicas tanto del hongo como de la bacteria; en el agar King B se seleccionaron las colonias las cuales son formadoras de fluorescencia y para el hongo colonias verde pulverulentas. Además, estas colonias, se sembraron en Agar Cetrimide, Agar gelatina, TSI (agar triple azúcar), LIA (agar hierro-lisina), citrato y O-F para maltosa y glucosa) y con respecto a *Penicillium* se identificó mediante la técnica de observación en fresco con Lactofenol para observar el morfotipo de la colonia. Posteriormente las colonias fueron guardadas en refrigeración a 8°C.

3. Prueba de degradación en tubo de petróleo crudo:

Para la obtención del inóculo, cada bacteria nativa se cultivó en 10mL de caldo nutritivo a 30°C durante 24 horas. Posteriormente el caldo nutritivo se centrifugó durante 10 minutos, su concentración celular fue estandarizada con el tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland ($9 \times 10^8 \text{ cel/mL}^{-1}$). Y para los hongos se sembraron en placas de Petri con Agar Sabouraud, realizando la misma suspensión que la bacteriana.

Por triplicado se inoculo en 10 mL de caldo Bushnell Haas, 1mL de inóculo y 0.1mL de petróleo crudo (el caldo tiene como indicador el color purpura de bromocresol). La incubación se realizó a 30°C hasta por 10 días y para los hongos hasta 15 días. Este procedimiento se le aplicó agitación manual, diariamente por 10 minutos y en simultáneo se investigó el viraje del indicador de lila al amarillo, que se interpretó como positivo para la utilización del petróleo como fuente de carbono y energía.

Tercera fase: TPH's y fase de invernadero.

Fase de invernadero:

Se pesó 1kg de suelo contaminado, el cual fue homogenizado y tamizado previamente; este peso se colocó en 15 bandejas. Las cuales se señalaron a qué tipo de tratamiento y el número de repetición que correspondía

(etiquetado). El inóculo de cada microorganismo por triplicado, se obtuvo por el método de siembra a gran escala, trabajando con un inóculo madre, intermedio y definitivo (Carreño, 2012). Los microorganismos se seleccionaron y se cultivaron en 3mL de caldo nutritivo a 30°C durante 24 horas.

La concentración se estandarizó con el tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland, Para la solución se usó 0,2mL de la suspensión bacteriana estandarizada y se inocularon en 1,8mL de caldo Busnell Haas con 5% de petróleo crudo, esto fue incubado a 30°C por 24 horas, (Inóculo madre). El resultado fue inoculado en 22mL de caldo Busnell Haas con petróleo crudo incubándose a 30°C por 24 horas para constituir el inóculo intermedio el cual a su vez fue inoculado en 176mL del mismo caldo Busnell Haas, incubado en las mismas condiciones, constituyendo el inóculo definitivo en una cantidad de 200ml.

Prueba de TPH's.

La prueba se realizó de acuerdo al procedimiento ya descrito (p. 35), esto después de evidenciar el tiempo de germinación.

3.6 Métodos de análisis de datos

Material biológico:

Para el siguiente trabajo de investigación se tiene como material biológico a la *Pseudomonas putida* y *Penicillium* sp. Que fueron aislados de un suelo contaminado con hidrocarburos (petróleo).

Aspectos técnicos

Ubicación geográfica

Las muestras de suelo contaminado que se obtuvieron, se encontraron en un grifo llamado "el chofer" el cual está ubicado en el distrito de Reque, provincia de Chiclayo, Departamento de Lambayeque.

Los límites del centro de compostaje son los siguientes:

- Por el norte: calle Mariscal Castilla (Parque de la madre)
- Por el sur: Camino al sector las Delicias y al colegio Diego Ferré
- Por el este: Parque de “los Héroes” sector Villa el sol
- Por el oeste: terreno agrícola del sector “Repector”.

Población y muestra:

La población estuvo representada por un suelo contaminado con petróleo, debido al derrame del trasvase de este insumo, el suelo provenía de un grifo ubicado en el distrito de Reque. Del cual se tomaron 30 muestras de 1 kg. , las cuales fueron recolectadas el 07 de mayo del 2018, las muestras recolectadas fueron obtenidas de acuerdo a la guía del Ministerio del ambiente, en donde se hace referencia a los diferentes tipos de muestreo de acuerdo a la cantidad de terreno en estudio.

Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis:

Para contrastar la hipótesis, el siguiente trabajo de investigación contiene 3 fases las cuales; en la primera fase, se obtuvo la muestra de suelo contaminado con hidrocarburo con el que se trabajara, también se hizo los análisis físico químicos y TPH's previos (para conocer como encontramos el suelo); en la segunda fase; se aislaron e identificaron las cepas microbiológicas como *Pseudomonas putida* y el *Penicillium* sp. (*Penicillium chrysogenum*).

Se hizo además la identificación bioquímica y morfológica de las cepas y finalmente en esta fase se realizó la prueba de degradación de hidrocarburos; En la tercera fase, se hicieron pruebas para demostrar la eficiencia de microorganismos capaces de degradar petróleo como la preparación del inóculo, y el pase a invernaderos para determinar que repetición iría a analizar el suelo después de todo el proceso.

El estudio se realizó 4 tratamientos y 3 repeticiones por cada uno de estos.

Tabla 2: Tratamiento y repeticiones

Tratamientos	Repeticiones		
Tratamiento control (agua destilada + suelos contaminado con hidrocarburos)	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3
<i>Pseudomona Putida</i> + suelo contaminado con hidrocarburos	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3
<i>Penicillium</i> sp. + suelo contaminado con hidrocarburos	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3
Consortio microbiano (<i>Pseudomona putida</i> + <i>Penicillium</i> sp) + suelo contaminado con hidrocarburos	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3

Fuente: Tratamientos incorporados en la investigación.

Primera fase: obtención de muestras:

Lugar de muestreo:

Las muestras se obtuvieron del grifo “el chofer” ubicado en el panamericana norte, donde existe la problemática de derrame de petróleo, el muestreo se realizó de acuerdo a la “Guía del Ministerio del Ambiente”: Guía para el muestreo de suelos, MINAM. Lima, (2014.)

La siguiente metodología es Para áreas cuya contaminación sea de forma irregular y que tenga un terreno menor a 1 000 m² y hasta 5 000 m²

“El Número de muestras y distribución, será de una muestra por cada 15 – 20 metros lineales en las paredes del perímetro del área excavada y 2 en el fondo según la superficie (áreas menores a 1 000 m²) y 3 o 4 para áreas hasta 5 000 m², según sea el caso.” (p. 15)

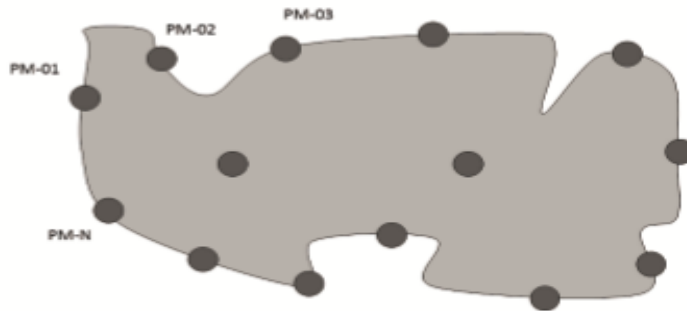


Figura 1: Localización de puntos de muestreo en el área de excavación irregular

Fuente: técnica de muestreo de suelos contaminados MINAM

El suelo que se tiene como muestra, proviene del distrito de Reque, el cual muestra un suelo útil para la agricultura, es decir al mostrar una realidad problemática como la de estar contaminado con hidrocarburos los componentes de este suelo estar alterados o simplemente los convierte en no aptos para el cultivo.

a) Obtención de muestras de suelos:

Las muestras se recogieron el 07 de mayo del 2018, la cuales se obtuvo un muestreo de 30 puntos con un peso aproximado de 1 kg. Las cuales se etiquetaron y depositaron en bolsas herméticas, estas tenían una profundidad de 35 cm. Estas bolsas se depositaron en un depósito en el cual se mezcló, obteniendo un suelo compuesto. Y se llevó al laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo del departamento de Lambayeque. Para ser procesados.

b) Análisis físico químicos y TPH's:

1. pH

Fernández et al, (2006), El suelo tiene una propiedad química el cuyo efecto es importante en el desarrollo de seres vivos aquí se incluyen a los microorganismos y por supuesto a las plantas, la acidez o alcalinidad del suelo se halla por medio de un electrodo el cual tiene una relación suelo – agua y es expresado en escala de pH. Las variaciones de pH en el suelo se determinan por la acidez, la neutralidad y la alcalinidad.

Método

Para la determinar I pH se utiliza como método el potenciométrico

Material y equipo

Los materiales y equipos que se usaron son:

- 1gr. de suelo (por muestra)
- agua destilada.
- Una Pipeta de 10 ml.
- Vasos de precipitación de 25 ml.
- Imanes o agitadores magnéticos.
- Potenciómetro.
- Una balanza de preferencia, Balanza analítica
- Además de un piceta para lavar el electrodo, etc.
- Y finalmente Soluciones amortiguadora de pH 7 y 4. (para calibración del equipo).

3.7 Aspectos éticos

La presente investigación tuvo como objetivo principal la comparación de microorganismos los cuales se trabajaron con los métodos adecuados y necesarios para que la experimentación se concrete, además de poseer datos veraces y confiables, ya que se está trabajando con semillas y un insumo de difícil absorción natural por parte del ecosistema en problema, el suelo.

Cada resultado se trabajó con el cuidado y la ética correspondiente, siguiendo el procedimiento oportuno para cada análisis, por tal motivo como profesional hago referencia de los métodos usados y que están verificados por una galería fotográfica además de la firma de los profesionales a cargo de las áreas.

Para finalizar, este trabajo se desarrolló con total responsabilidad y respeto no solo al profesional experto, sino también a cada característica del estudio.

IV. RESULTADOS

Tabla 3: Resultados del análisis de humedad

		Humedad		
Tratamientos		Peso final de suelo seco	*peso inicial de suelo	%
		Muestra control	0.614	1
	<i>Pseudomonas putida</i>	0.658	1	34.2
	Consortio microbiano	0.682	1	31.8
	<i>Penicillium sp.</i>	0.725	1	27.5

Fuente: Resultados de análisis de humedad de suelo contaminado con hidrocarburos.

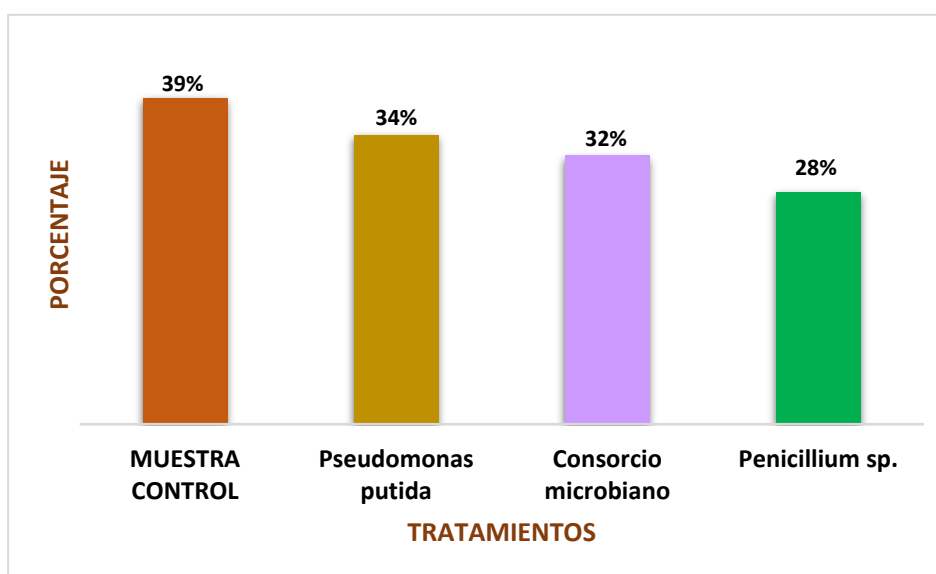


Figura 2: Porcentaje de humedad

Fuente: Porcentajes de humedad resultados de análisis

Los resultados que se muestran fueron analizados en el laboratorio y calculados a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad del suelo} = (\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) / \text{Peso inicial} * 100$$

En el tratamiento de *Penicillium sp.* Junto con el suelo contaminado al realizar el análisis de humedad arrojo un resultado de 28 % de humedad en el suelo a comparación de la muestra control (38%). La retención de humedad en suelos con hidrocarburos es muy complicada de medir ya que existen componentes viscosos que hacen que la retención de agua sea en el área superficial del suelo haciendo que sea difícil de rehidratar. Por lo tanto puedo afirmar que la utilización de microorganismos como el *Penicillium sp.* Logra degradar componentes aceitosos que en el suelo se encuentren. Sin embargo *Pseudomonas putida* alcanzo un porcentaje de 34% de humedad correspondiente al suelo en su tratamiento, lo cual me indica que durante el tiempo tratado no degrado la suficiente cantidad de componentes de aceitosos en el suelo

Tabla 4: Resultados para el análisis de pH

pH	
Muestra control	7.67
Tratamientos	
<i>Pseudomonas putida</i>	7.52
Consortio microbiano	6.37
<i>Penicillium sp.</i>	7.05

Fuente: Análisis de pH de suelo contaminado con hidrocarburos.

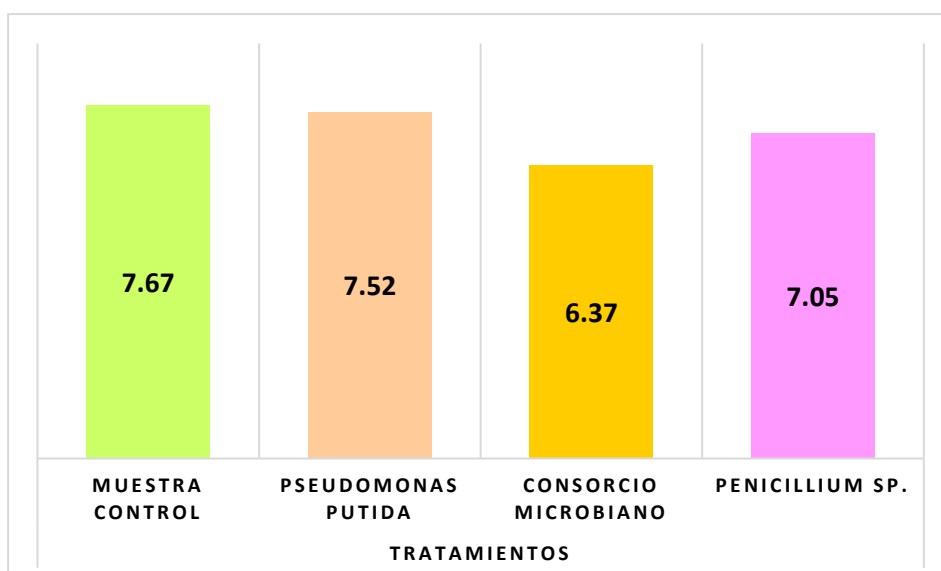


Figura 3: Gráficos de barras de pH

Fuente: pH de suelo contaminado con hidrocarburos.

De acuerdo a la muestra control, el pH que resulta de los tratamientos por *Pseudomonas putida* y *Penicillium sp.* Arrojando un resultado Moderadamente alcalino de acuerdo al criterio de evaluación (Tabla N° 2 p.32) esto puede ser que en el momento de metabolizar el hidrocarburo hayan sufrido algún tipo de cambio en el agar (Absorción De Minerales); mientras que en el tratamiento aplicando el consorcio microbiano muestra un pH de 6.37 el cual aplica un criterio moderadamente ácido, demostrando que la degradación del consorcio microbiano es más fuerte comparando a los otros tratamientos. Todos los tratamientos se encuentran dentro del rango de biorremediación.

Tabla 5: Resultados para el análisis de conductividad eléctrica

Conductividad Eléctrica		
Tratamientos	Muestra control	7.52
	<i>Pseudomonas putida</i>	7.14
	<i>Penicillium sp.</i>	7.02
	Consortio microbiano	6.58

Fuente: Análisis de conductividad eléctrica del suelo contaminado con hidrocarburos.

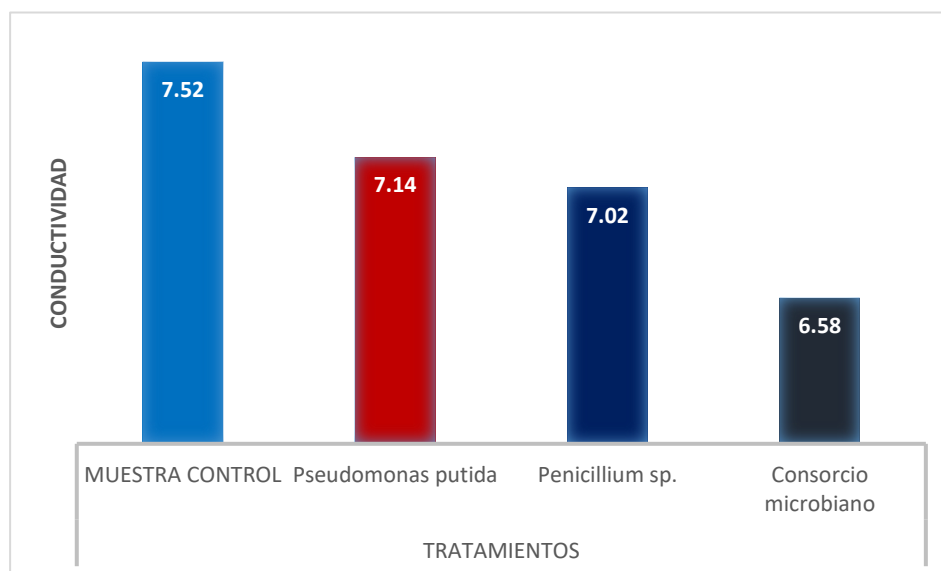


Figura 4: Gráfico de barras de conductividad eléctrica

Fuente: Niveles de conductividad eléctrica en mmhos.

De acuerdo a la muestra control, la conductividad eléctrica que aquí muestra es que el suelo se encuentre moderadamente salino, el cual no repercute en el cultivo de semillas, demostrando que este tipo de microorganismos no afecta al suelo para tal actividad; la contaminación por hidrocarburos (petróleo) debería diferenciarse en este parámetro desde el primer momento (muestra control) el cual no se evidenció, indicando que el suelo puede ser biorremediado atrayendo el contaminando mas no lo dejó inutilizado.

Tabla 6: Resultado del análisis de HTP'S. o TPH'S

		Datos de HTP's				
		RA	RB	Peso de suelo	Factor de conversión	Factor de humedad
Tratamientos	Muestra control	296.2 4	297.6 7	1.78	1000	0.614
	<i>Pseudomonas putida</i>	296.2 4	297.5 1	1.89	1000	0.658
	Consortio microbiano	296.2 4	297.4 6	1.91	1000	0.672
	<i>Penicillium sp.</i>	296.2 4	297.1 5	1.95	1000	0.725

Fuente: Análisis de hidrocarburos totales de petróleo (HTP's o TPH's) de suelo contaminado con hidrocarburos.

Aquí se observan datos como:

- RA: Peso del balón (rotavaporador) a peso constante.
- RB: Peso del balón + sobrenadante orgánico (aceite).
- El factor de conversión que se obtiene de la formula (p.37)

Tabla 7: Factor de humedad

Porcentaje de humedad	Resultado
38.6	0.614
34.2	0.658
32.8	0.672
27.5	0.725

Fuente: Elaboración propia

El factor de humedad se obtiene haciendo un cálculo $(1-(\% \text{ de humedad}/100))$ el cual arroja datos que servirán para hallar la concentración de hidrocarburos en el suelo.

Tabla 8: Concentración de HTP's. mg/kg de s.s.

HTP's				
		HTP's	% de concentración	
Tratamientos	Muestra control	1226.42	mg/kg s.s	
	<i>Pseudomonas putida</i>	1030.84	mg/kg s.s	16
	Consorcio microbiano	985.46	mg/kg s.s	20
	<i>Penicillium sp.</i>	742.86	mg/kg s.s	39

Fuente: Elaboración propia

Finalmente, después de los cálculos con los datos obtenidos anteriormente tenemos la concentración de hidrocarburos en suelo seco y su porcentaje.

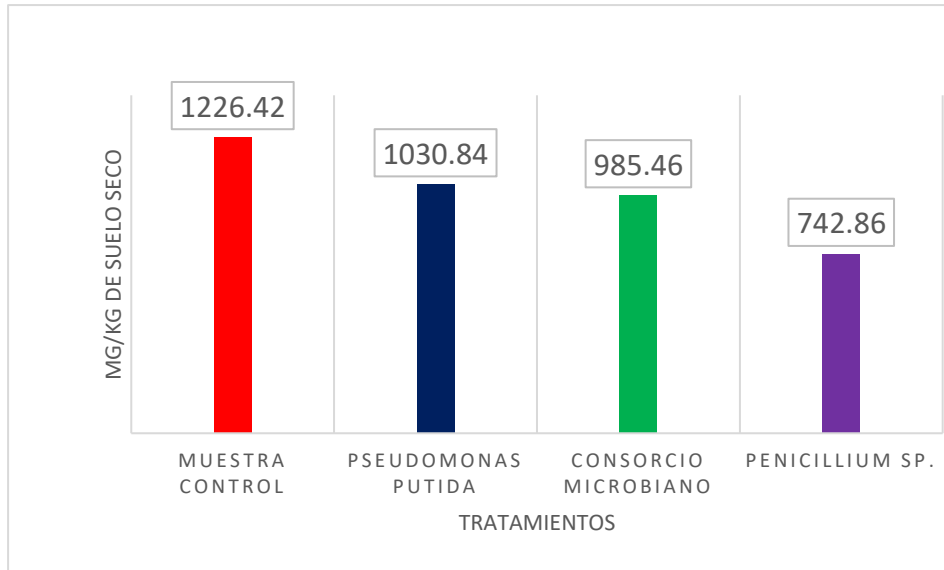


Figura 5: Gráfico de barras de la concentración de HTP's en el suelo.

Fuente: Concentración de HTP's o TPH's en mg de hidrocarburos /kg de suelo seco.

Las gráficas nos muestran el grado de concentración en mg de HTP's por kg de suelo seco, indicando que después de los tratamientos el *Penicillium sp.* (*Penicillium chrysogenum*) fue el que metabolizó más el hidrocarburo.

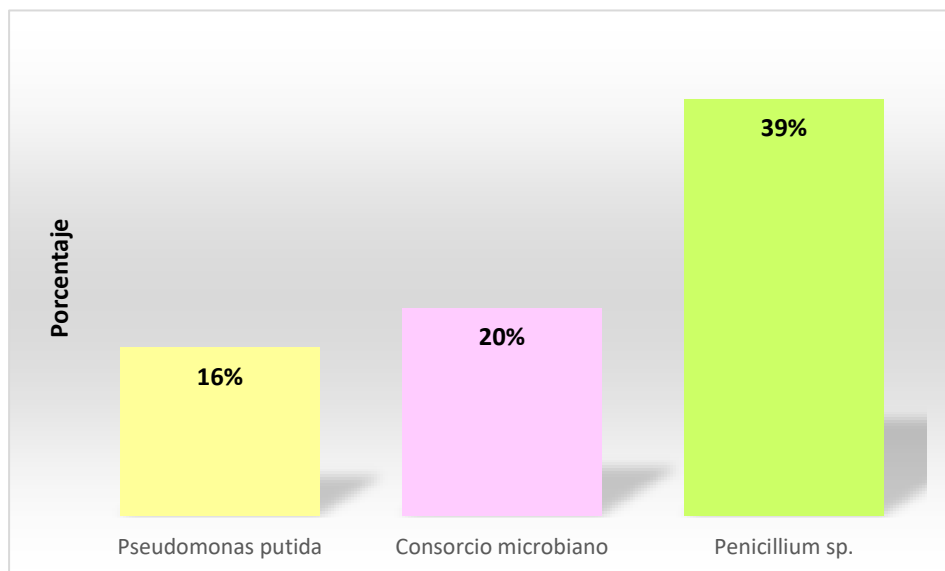
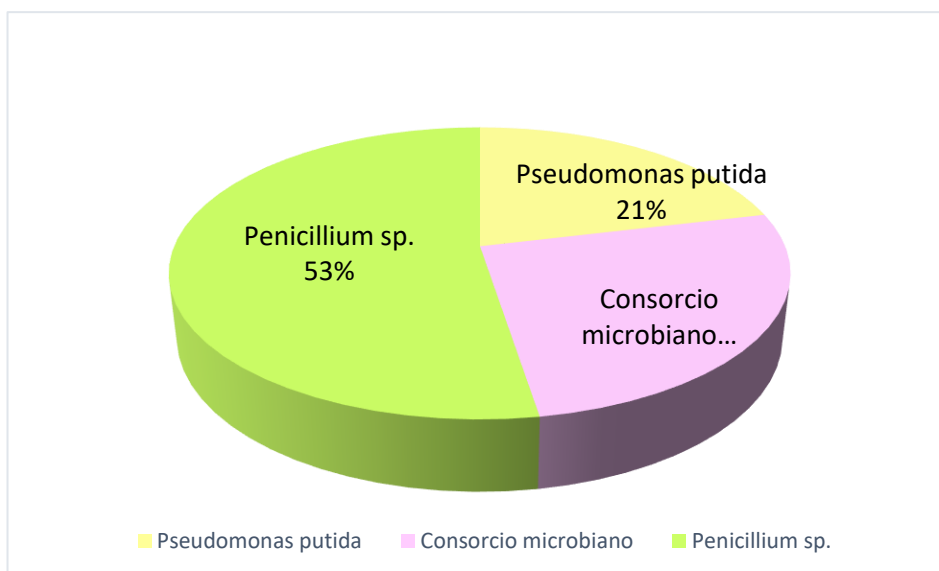


Figura 6: Porcentaje de concentración de HTP's en mg/Kg de s.s

Fuente: Elaboración propia

En las gráficas muestran el grado de concentración despues de cada tratamiento, aquí se evidencia que sin lugar a dudas el tratamiento que mas degrado hidrocarburos en el suelo fue el tratado con *Penicillium sp.*; en comparación con *Pseudomonas putida* y el consorcio microbiano.



Porcentaje de remoción de HTP's

Fuente: porcentajes de remoción de HTP's o TPH's

En el porcentaje de remoción nos da que el *Penicillium sp.* remueve el 53 % de hidrocarburos, el consorcio microbiano el 21% y *Pseudomonas putida* el 26%, esto pudo acontecer por el tiempo de crecimiento y deegracion de los microorganismos, o por que en el momento de realizar los análisis fueron muestras compuestas de las repeticiones por cada tratamiento.

Rechazando mi hipótesis en donde menciono que el tratamiento por *Pseudomonas putida* es el que mas porcentaje de remocion obtenia despues de la investigación.

Tabla 9: Tratamiento, crecimiento y viraje

	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
<i>Pseudomonas putidas</i> "A"	No viro	No viro	Viro
	12 horas	24 horas	12 horas
	*	**	***
<i>Pseudomonas putidas</i> "B"	Viro	Viro	No viro
	12 horas	12 horas	12 horas
	**	**	*
<i>Penicillium</i> sp. (blanco)	Viro	No viro	Viro
<i>Penicillium chrysogenum</i> "P"	24 horas	96 horas	24 horas
	**	*	***
	<i>Penicillium</i> sp. (verde)	Viro	Viro
<i>Penicillium chrysogenum</i> "Q"	96 horas	96 horas	120 horas
	**	***	**

Fuente: Degradación de petróleo

Esta tabla se obtuvo del proceso de degradación in vitro en la prueba de laboratorio, aquí se apreció el tiempo de viraje de cada microorganismo aislado y los asteriscos (*) muestran como fue disminuyendo el petróleo en los tubos.

El periodo de viraje puede interferir de alguna forma en la prueba de invernadero, el cual se evidenció en el crecimiento o germinación de las semillas inoculadas.

Las dos *Pseudomonas putidas* muestran que en el tiempo de viraje no excede de las 24 horas pero su absorción de petróleo es mínimo, mientras que en el *Penicillium* sp (*Penicillium chrysogenum*) ambos P y Q indican que su tiempo de viraje es mayor pero su efectividad en el proceso de metabolización es más fuerte.

V. DISCUSIÓN

PARDO et al. (2004) Hace mención de la técnica de biolabranza y los parámetros como el pH, conductividad eléctrica, humedad y temperatura, además determino los hidrocarburos totales, y este experimento duro 4 meses, obteniendo un porcentaje de remoción de 91% utilizando un fertilizante orgánico, tal cual en mi investigación hago referencia de la utilización de microorganismo eficientes en degradación de hidrocarburos y sus derivados, obteniendo un 53 % de remoción por medio del metabolismo del *Penicillium* sp. (*Penicillium chrysogenum*), a través de la técnica de biolabranza y bioventeo.

BRACHO et al. (2004) dice que los hidrocarburos aromáticos son complicados de remover de un ecosistema terrestre, en mi investigación demuestro que la biorremediación de suelos usando microorganismos, se pueden remover este tipo de hidrocarburos, dependiendo además de que tipo de contaminante absorba más las especies estudiadas, ya que no todos los microorganismos metabolizan el mismo compuesto.

Este mismo autor utiliza a la *Pseudomonas* como fuentes de obtención de hidrocarburos el cual obtuvo un 100% de remoción de hidrocarburos aromáticos, sin embargo, mi investigación arroja que *Pseudomonas putida* (especie estudiada para la metabolización de hidrocarburos) degrada un 21% de hidrocarburos.

MARTÍNEZ et al, (2011) hace mención que en su investigación utiliza lodos residuales como sabemos este tipo de lodos tiene una carga orgánica con variedad de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos y sus derivados. Así como *Pseudomonas putida* y *Penicillium* en este caso el *Penicillium chrysogenum*, especies que fueron estudiadas y evaluadas en la presente investigación.

BENAVIDES et al, (2006). Analizó la biorremediación como una alternativa de solución para este tipo de contaminación de suelos por hidrocarburos, realizo experimentos inoculando consorcios microbianos las cuales también fueron aisladas del suelo en cuestión encontrando *Pseudomonas* sp. durante su proceso de aislamiento; sin embargo a pesar de haber sido aislada directamente de mi suelo contaminado en los tratamientos realizados la *Pseudomona* no llega a degradar

tanto como el *Penicillium*, también se hizo una comparación con el tratamiento de consorcio microbiano el cual tuvo un 26% de remoción, dando como resultado final que los microorganismos obtenidos del propio suelo no siempre actúan con total eficacia como se querría, esto también depende del tiempo de viaje y el tipo de compuesto que degraden.

VI. CONCLUSIONES

1. Se llegó a concluir de acuerdo a los parámetros analizar que el pH, la conductividad eléctrica y la humedad del suelo no hay cambios que signifiquen una alteración en materia de utilizar el suelo como útil para la agricultura.
2. En el aislamiento de microorganismos se obtuvieron 2 cepas de *Pseudomonas putida* y 2 cepas de *Penicillium* sp. En la que resulto *Pencillium chrysogenum* este se identificó por la morfología de este tipo de hongo.
3. El porcentaje de remoción de TPH's o HTP's para el tratamiento con *Penicillium* sp. (*Penicillium chrysogenum*) fue de 53% a comparación de los otros tratamientos con microorganismos
4. Se concluyó que el hongo (*Penicillium chrysogenum*) degradó el hidrocarburo que se encontraba como contaminante del suelo.
5. De acuerdo a los resultados, previamente se obtuvo una tabla donde mostraba la degradación de hidrocarburos por las cepas estudiadas la cual ayudo para sacar las muestras que se llevarían a analizar.
6. En esta investigación se llegó a concluir que la técnica de biorremediación utilizando microorganismos en la contaminación de suelo por hidrocarburos, no afecta directamente al suelo y su fertilidad si no que esta técnica ataca directamente a los componentes de los hidrocarburos.

VII. RECOMENDACIONES

- 1.** El suelo que aquí se ha restaurado a través de microorganismos debe ser utilizado en siembras de tallo alto o de forma ornamental siempre y cuando estos no se encuentren expuestos directamente a la superficie del suelo remediado.
- 2.** Se recomienda que en este tipo de investigaciones se aíslen más de 2 cepas microbianas, para de esta manera tener en reserva y más efectividad en el procedimiento de la técnica de bioventeo.
- 3.** Para este tipo de investigaciones se recomienda además tener el cuidado en los tiempos desde la fase de muestreo hasta la fase de invernadero, para así obtener datos más precisos.
- 4.** Se recomienda que los parámetros analizados se hagan por separado de acuerdo a las repeticiones y tratamientos.
- 5.** En el análisis de HTP's es recomendable realizarlos con anticipación por muestra de acuerdo al procedimiento que es un poco largo, además de tener cuidado con los reactivos, tener a la mano o leer antes la hoja de seguridad de cada uno de ellos.
- 6.** Se recomienda también realizar la efectividad de las semillas, sea el caso de usarla en la experimentación, así se identificará si las semillas están aptas para el estudio. Estas deben estar aprobadas por la NTP (Norma Técnica Peruana).
- 7.** Se recomienda además realizar análisis de espectrofotometría para observar mejor la degradación de cada compuesto de los hidrocarburos y determinar qué tipo de compuesto se degrada más.

REFERENCIAS

PARDO Castro, Jenny Liliana; PERDOMO Rojas, María Carolina y BENAVIDES López de Mesa, Joaquín L. “Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo”. Bogotá D.C., Colombia. (2004)

BRACHO, Mariangela; DÍAZ, Laugeny y SOTO, Luz Marina “Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas* spp.” Venezuela. (2004)

MARTÍNEZ Prado, Adriana; OSORIO Rodríguez, Ana Lilia, GURROLA Nevárez, Blanca Amelia; PINTO Espinoza, Joaquín y PÉREZ López, Ma. “Biorremediación De Suelo Contaminado Con Hidrocarburos Empleando Lodos Residuales Como Fuente Alterna De Nutrientes”. México (2011)

BENAVIDES López de Mesa, Joaquín; GUTIÉRREZ Riaño, Sandra Milena; GUEVARA Vizcaíno, Andrea Liliana; QUINTERO, Gladis; JAIMES Cáceres, Diana Carolina; MIRANDA García, Johanna. “Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo”. Colombia (2006).

TORRES Delgado, Katerine y TATIANAN Zuluaga, Montoya. “Biorremediación De Suelos Contaminados Por Hidrocarburos” Universidad Nacional De Colombia (2009)

DIAS, Romina Laura. “Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en clima frío y templado. Ensayo y evaluación de distintas estrategias”. Argentina (2011)

TRUJILLO Toro, María Alejandra y RAMÍREZ Quirama, Juan Fernando. “Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia” Colombia (2012)

ROCKNE, Karl J.; SANFORD, Robert A.; HEDLUND, Brian P., CHEE SANFORD, Joanne C.; STRAND, Stuart E AND STALEY, James T. "Anaerobic Naphthalene Degradation by Microbial Pure Cultures under Nitrate-Reducing Conditions". Seattle, Washington. (2000)

GUÍA PARA EL MUESTREO DE SUELOS - Ministerio Del Ambiente. Dirección General De Calidad Ambiental. -- Lima: MINAM, 2014.

FERNÁNDEZ Linares, Luis Carlos; ROLDÁN Carrillo, Teresa Guadalupe; URIBE Hernández, Raúl; RAMÍREZ Islas, Martha Elena; ZEGARRA Martínez Héctor Gustavo; FLORES Hernández David, ROJAS Avelizapa Norma Gabriela, REYES Ávila, Romeo Jesús; ARCE Ortega, Juan Manuel. "Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados" Instituto Mexicano del Petróleo. México, D.F. (2006)

BUENDÍA R, Hildebrando. "Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol" Lima (2013).

VALENZUELA F., Eduardo; SOLÍS M., Loretto; MARTÍNEZ V., Oscar y PINOCHET T., Dante. "Hongos Aislados Desde Suelos Contaminados Con Petróleo". Chile (2006)

PONCE Contreras, Daniela Soledad. "Biorremediación De Suelos Contaminados Con Hidrocarburos". Chile (2014).

Carreño, C. "Manual de Prácticas de Microbiología Industrial" Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque. (2012)

ANEXOS

Anexo 01: Operacionalización de variables: “biorremediación de suelo contaminados con hidrocarburos”.

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición
biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos	La biorremediación consiste en usar microorganismos (hongos, bacterias) para acelerar la tasa de degradación natural de los contaminantes para descomponerlas o degradarlas en sustancia menos tóxicas o no tóxicas obteniendo un suelo útil para la agricultura por el uso de nutrientes.	La investigación se va a dar en 3 fases, la primera es el muestreo y el análisis de la muestra control; el segundo fue el aislamiento de los microorganismos en este caso <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Penicillium sp. (Penicillium chrysogenum)</i> aquí se realizaron todas las pruebas para reconocer su especie y la tercera fase fue la de llevar el suelo a invernadero inoculando los microorganismos (agar virilizado), en esta fase se colocaron las semillas de rabanito y se esperaron 3 días para sus análisis físico químicos.	pH Conductividad eléctrica extracción de HTPs	6 y 8 mmhos HTPs/kg. Mg de HTP's/kg de s.s.

Fuente: Elaboración propia

Anexo 02: Resultados fisicoquímicos de laboratorio



LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA

TIPO DE ANÁLISIS: fisicoquímico

USUARIO: Iveth Simone Samamé Pisfil

MUESTRA: 03

TIPO DE MUESTRA: suelo

FECHA DE EMISIÓN: 16 de Julio del 2018

RESULTADOS:

MUESTRA 01			
PARÁMETRO	pH	C.E	EQUIPO
Muestra control	7.67	7.52	pHmetro/ conductímetro
<i>Pseudomonas putida</i>	7.52	7.14	pHmetro/ conductímetro
Consorcio microbiano	6.37	7.02	pHmetro/ conductímetro
<i>Penicillium sp.</i>	7.05	6.58	pHmetro/ conductímetro

MUESTRA 02 - HTP's			
PARÁMETRO	RA	RB	PESO DE SUELO
Muestra control	296.24	297.67	1.78 mg
<i>Pseudomonas putida</i>	296.24	297.51	1.89 mg
Consorcio microbiano	296.24	297.46	1.91 mg
<i>Penicillium sp.</i>	296.24	297.15	1.95 mg

MUESTRA 03			
PARÁMETRO	PESO FINAL DE SUELO SECO	PESO INICIAL DE SUELO	HUMEDAD (%)
Muestra control	0.614	1.00	38.6
<i>Pseudomonas putida</i>	0.658	1.00	34.2
Consortio microbiano	0.682	1.00	31.8
<i>Penicillium sp.</i>	0.725	1.00	27.5

Nota: la muestra fue tomada por el usuario, el laboratorio no se responsabiliza.

* PESO DE SUELO PARA ANÁLISIS (SUELO + SULFATO DE SODIO SECO)

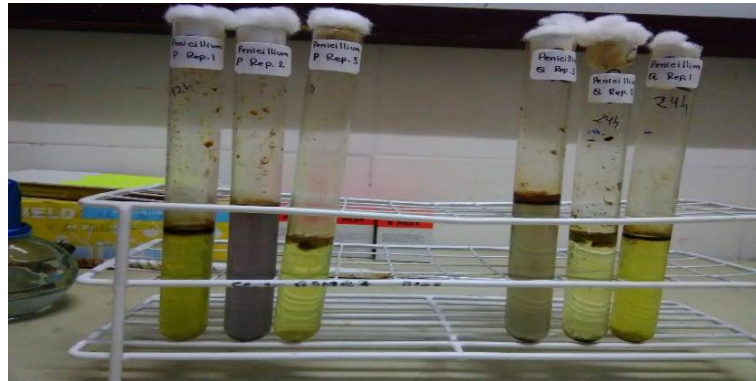
*RA: PESO DEL BALÓN A PESO CONSTANTE

*RB: PESO DEL BALÓN MAS SOBRENADANTE ORGÁNICO (ACEITE)

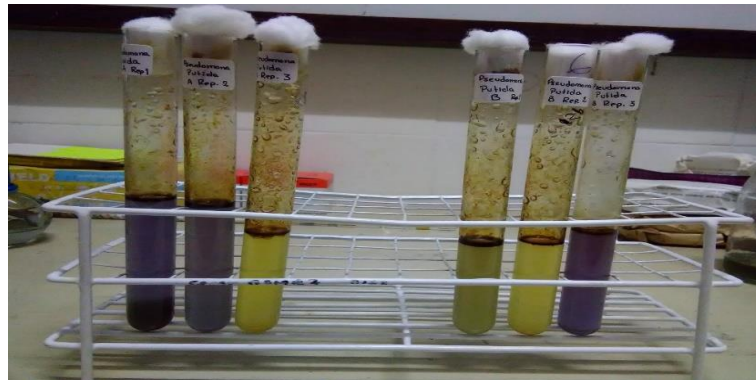
* TODOS ANÁLISIS SE HICIERON POR MUESTRA COMPUESTA (3 REPETICIONES)



Anexo 03: Registro fotográfico



Prueba in vitro, Degradación de Petróleo Crudo (*Penicillium sp.*)



Prueba in vitro, Degradación de Petróleo Crudo (*Pseudomonas putida*)



Viralización de Pseudomonas



Bioaumentación de microorganismos caldo madre a intermedio



Inoculación de *Pseudomonas putida* (Pruebas Bioquímicas)



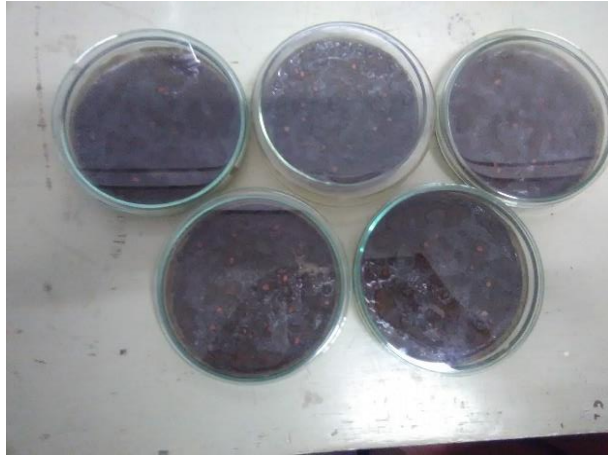
Resultado de pruebas bioquímicas (*Pseudomonas putida*)



Medición de Radícula. (*Raphanus sativus*)



Germinación de semillas



Resultado de la prueba de fitotoxicidad.



Pesado de suelo



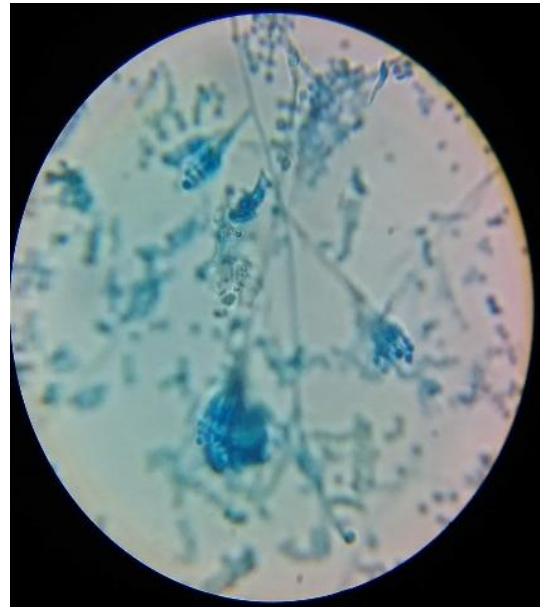
Suelo sobre la placa petri (Prueba de fitotoxicidad)



Cepas bacterianas aisladas (*Penicillium Sp.*)



Prueba en fresco



Morfología del hongo (vista microscopio).



Fase de invernadero



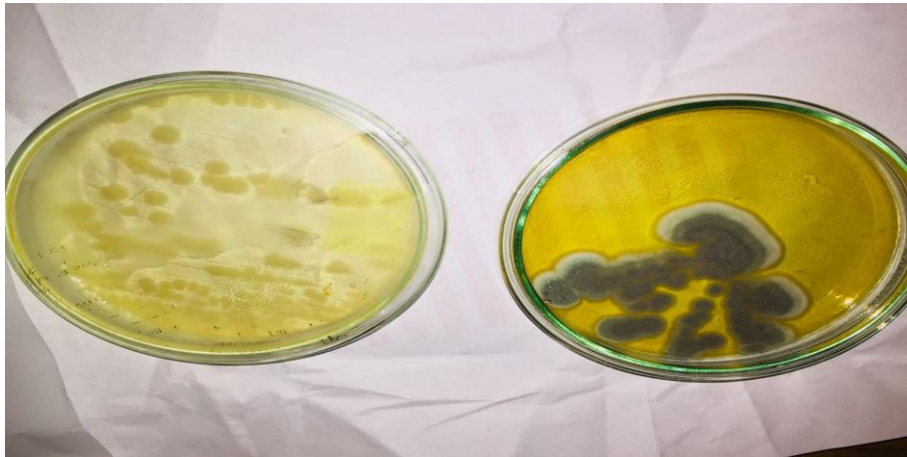
Viralización de *Pseudomonas putida*



Prueba control semillas



Obtención de extracto del hongo. (*Penicillium Sp.*)



Pseudomonas Putida 120 h a 30°C en agar nutritivo (derecha) y Hongo *Penicillium Sp.* 120 horas a 30 °C (izquierda).



Análisis Físico químicos y HTP'S (pH) Análisis



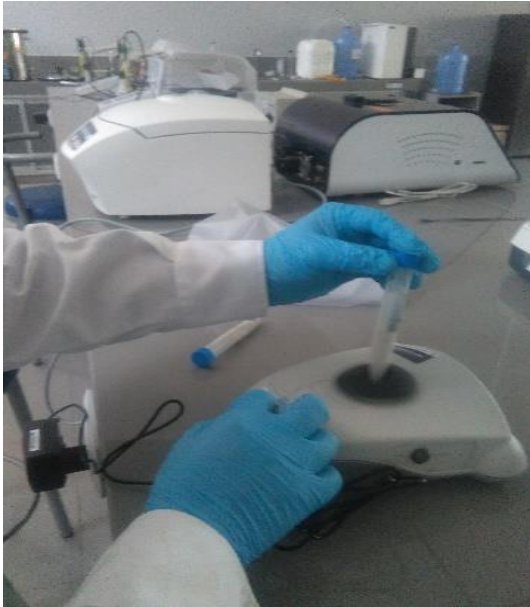
Físico Químicos Conductividad Eléctrica



Análisis de HTP's (Humedad)



Pesado de Sulfato de Sodio



Análisis de HTP's, Agitación



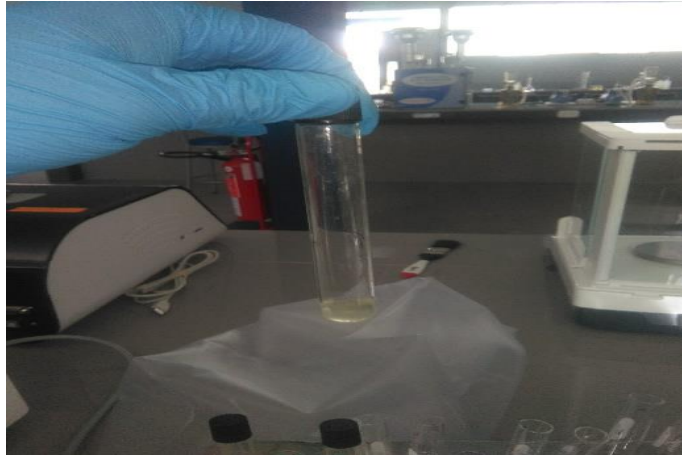
Extracto de sobrenadante



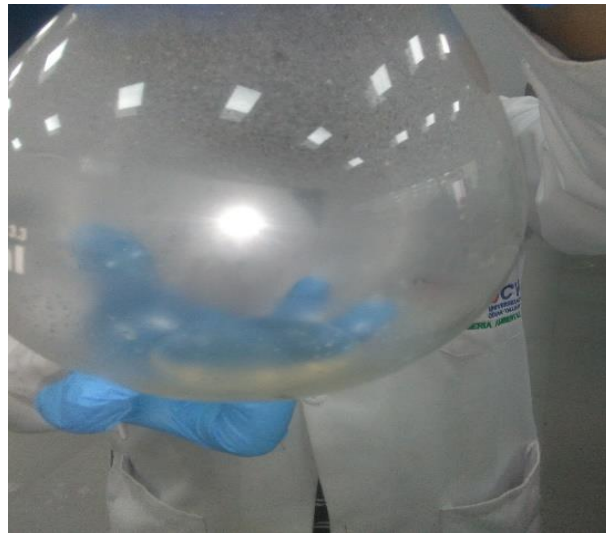
Análisis de HTP'S. Rotavaporador



Material en desecador



Sobrenadante del extracto orgánico



Hidrocarburo resultante