



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO GALLO
ESCUELA DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS
MENCIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL



**Eficiencia de consorcios de bacterias sulfato reductoras
en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos
del petróleo en microcosmos, junio – octubre de 2018**

TESIS
PARA OPTAR EL GRADO DE ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTADA POR:

Lic. Salvador Tomás Orrego Zapó

Lambayeque, Perú

2019

**Eficiencia de consorcios de bacterias sulfato reductoras
en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del
petróleo en microcosmos, junio – octubre de 2018**

Lic. Salvador Tomás Orrego Zapo

AUTOR

Dra. Carmen R. Carreño Farfán

ASESOR

Presenta a la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo
para optar el Grado de: Maestro en Ciencias con Mención en Ingeniería
Ambiental

Aprobado por:

Dr. Cesar Alberto García Espinoza.

PRESIDENTE DEL JURADO

Dra. Giannina Llontop Barandiarán

SECRETARIA DEL JURADO

Dr. Cesar Alfredo Vargas Rosado

VOCAL DEL JURADO

Mayo, 2019

ÍNDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. ANÁLISIS DEL OBJETO DEL ESTUDIO.....	4
1.1. Ubicación.....	4
1.2. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	4
1.3. Población y muestra.....	6
1.4. Variables.....	6
1.5. Material biológico.....	6
1.6. Primera fase: Obtención, comparación y selección de consorcios de bacterias sulfato reductoras.....	8
1.7. Segunda fase: Degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo por tres consorcios de bacterias sulfato reductoras.....	18
1.9. Análisis estadístico de los datos.....	21
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	22
2.1. Antecedentes de la investigación.....	22
2.2. Base Teórica.....	24
CAPÍTULO III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	28
3.1. Consorcios de bacterias sulfato reductoras obtenidos de lodo residuales.....	37
3.2. Comparación de la eficiencia de tres consorcios de bacterias sulfato reductoras en la degradación anaerobia de benceno, tolueno y xileno.....	38

Discusión.....	55
Conclusiones.....	59
Recomendaciones.....	60
Referencias bibliográficas.....	61
ANEXOS.....	66

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación del lugar de muestreo en el distrito de San José, provincia Chiclayo, región Lambayeque, 2019.....	5
Figura 2. Ubicación de la Laguna de Estabilización de San José en la provincia de Chiclayo, región Lambayeque.....	5
Figura 3. Diseño experimental para determinar la eficiencia de consorcios de bacterias sulfato reductoras en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo, 2018.....	7
Figura 4. Vista aérea de las lagunas anaerobias de estabilización en el distrito de San José, provincia de Chiclayo, región Lambayeque.....	9
Figura 5. Extracción de muestra de lodo residual en laguna anaerobia.....	9
Figura 6. Muestras de lodo residual de planta de tratamiento de aguas residuales.....	10
Figura 7. Mezcla de sobrenadante de lodo residual sedimentado y sulfato de sodio.....	10
Figura 8. Mezcla de papel higiénico con yema de huevo.....	11
Figura 9. Incorporación de sales de calcio a mezcla de lodo residual.....	11
Figura 10. (A) Lodo residual sin (a) y con enriquecimiento (b).....	13
Figura 11. Adición de lodo enriquecido durante el armado de columna de Winogradsky.....	13
Figura 12. Lodo enriquecido y no enriquecido en columna de Winogradsky..	14
Figura 13. Película de aceite comestible en extremo superior de columna de Winogradsky.....	14
Figura 14. Columnas de Winogradsky selladas con papel aluminio.....	15
Figura 15. Obtención de alícuota de la zona sulfato reductora en la columna de Winogradsky.....	15
Figura 16. Medio Postgate C modificado, para la obtención de consorcios bacterianos.....	16
Figura 17. Medio Postgate C modificado, 30 días después de la inoculación de alícuotas de zona sulfato reductora.....	16
Figura 18. Tubos cubiertos con papel filtro, humedecido en una solución de acetato de plomo.....	17
Figura 19. Diseño de biorreactor tipo tanque anaerobio con sistema discontinuo.....	19

Figura 20. Biorreactor tipo tanque anaerobio con sistema discontinuo.....	19
Figura 21. Zonas diferenciadas en la columna de Winogradsky.....	29
Figura 22. Coloración verdosa tenue en la zona aerobia de la columna de Winogradsky.....	29
Figura 23. Coloración verdosa acentuada en la zona aerobia de la columna de Winogradsky.....	30
Figura 24. Coloración amarillenta en la zona aerobia de la columna de Winogradsky.....	30
Figura 25. Coloración rojiza en la zona aerobia de la columna de Winogradsky.....	31
Figura 26. Manchas rojas y anaranjadas en la zona microaerófila de la columna de Winogradsky.....	31
Figura 27. Manchas rojas en la zona microaerófila de la columna de Winogradsky.....	32
Figura 28. Pigmentación púrpura en la zona microaerófila de la columna de Winogradsky.....	32
Figura 29. Pigmentación roja y anaranjada en la zona microaerófila de la columna de Winogradsky.....	33
Figura 30. Pigmentación roja y anaranjada en la zona anaerobia de la columna de Winogradsky.....	33
Figura 31. Pigmentación anaranjada en la zona microaerófila de la columna de Winogradsky.....	34
Figura 32. Pigmentación roja y anaranjada en la zona anaerobia y microaerófila de la columna de Winogradsky.....	34
Figura 33. Pigmentación roja en la zona microaerófila de la columna de Winogradsky.....	35
Figura 34. Pigmentación roja en la zona microaerófila y aerobia de la columna de Winogradsky.....	35
Figura 35. Pigmentación roja en toda la columna de Winogradsky.....	36
Figura 36. Pigmentación verdosa encima de la zona anaerobia y debajo de la microaerófila de la columna de Winogradsky.....	36
Figura 37. Pigmentación púrpura en la zona anaerobia de la columna de Winogradsky.....	38
Figura 38. Puntos blancos en la zona anaerobia de la columna de Winogradsky.....	38
Figura 39. Mancha blanca en la zona anaerobia de la columna de Winogradsky.....	39

Figura 40. Ennegrecimiento en la zona anaerobia de la columna de Winogradsky.....	39
Figura 41. Escala convencional para calificar el sulfuro de plomo en papel filtro: ligero oscurecimiento (+), oscurecimiento (++) , platinado (+++) y negro platinado (++++).....	40
Figura 42. Papel filtro mostrando coloración por el sulfuro de plomo producido por consorcios de bacterias sulfato reductoras.....	40
Figura 43. Coloración negra platinado en papel filtro con sulfuro de plomo producido por consorcios de bacterias sulfato reductoras.....	41
Figura 44. Ennegrecimiento tenue del contenido del biorreactor a los 10 días de incubación.....	42
Figura 45. Ennegrecimiento acentuado en una parte del contenido del biorreactor a los 10 días de incubación.....	42
Figura 46. Ennegrecimiento acentuado en todo del contenido del biorreactor a los 10 días de incubación.....	43
Figura 47. Ennegrecimiento acentuado en el contenido y manguera del sistema anexo del biorreactor a los 10 días de incubación.....	43
Figura 48. Ennegrecimiento acentuado en la parte superior del contenido del biorreactor a los 20 días de incubación.....	45
Figura 49. Ennegrecimiento acentuado en sobre el papel higiénico en el contenido del biorreactor a los 20 días de incubación.....	45
Figura 50. Ennegrecimiento acentuado en todo el contenido del biorreactor a los 20 días de incubación.....	46
Figura 51. Ennegrecimiento acentuado en el contenido y manguera del sistema anexo del biorreactor a los 20 días de incubación.....	46
Figura 52. Ennegrecimiento acentuado en el contenido y manguera del sistema anexo del biorreactor a los 30 días de incubación.....	48
Figura 53. Ennegrecimiento acentuado en todo el contenido del biorreactor a los 30 días de incubación.....	48
Figura 54. Película en la superficie del contenido del biorreactor a los 30 días de incubación.....	49
Figura 55. Ennegrecimiento acentuado en el contenido y manguera del sistema anexo del biorreactor, durante la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos de petróleo.....	49
Figura 56. Turbidez observada en la cuantificación de sulfatos producidas por consorcios de bacterias sulfato reductoras.....	51

Índice de tablas

Tabla 1.	Cambios estándar de energía libre y cálculo de la posible síntesis de ATP por mol de hidrocarburos aromáticos oxidados a CO ₂ con diferentes aceptores de electrones.....	27
Tabla 2.	Sulfuro de plomo producido por consorcios de bacterias sulfato reductoras procedentes de columnas de Winogradsky.....	41
Tabla 3.	Ennegrecimiento en los biorreactores calificado según escala convencional después de 10 días en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo.....	44
Tabla 4.	Ennegrecimiento en los biorreactores calificado según escala convencional después de 20 días en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo.....	47
Tabla 5.	Ennegrecimiento en los biorreactores calificado según escala convencional después de 30 días en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo.....	50
Tabla 6.	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la cuantificación de sulfatos remanente en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo por tres consorcios de bacterias sulfatoreductoras durante 30 días.....	53
Tabla 7.	Análisis de varianza por los factores hidrocarburos aromáticos y consorcio de bacterias sulfato reductoras en la degradación anaerobia en microcosmos.....	54
Tabla 8.	Prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha=0,05$) para el factor hidrocarburos aromáticos durante la degradación anaerobia en microcosmos.....	54
Tabla 9.	Prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha=0,05$) para el factor consorcio de bacterias sulfato reductoras durante la degradación anaerobia en microcosmos.....	54
Tabla 10.	Prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha=0,05$) para la concentración de sulfatos remanentes en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos por consorcios de bacterias sulfato reductoras.....	55
Tabla 11.	Concentración de hidrocarburos aromáticos remanentes en los microcosmos al termino de la degradación anaerobia por consorcio de bacterias sulfato reductoras C4.....	55

RESUMEN

Se determinó la eficiencia de consorcios de bacterias sulfato reductoras en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo en microcosmos. Las bacterias de lodo residual se enriquecieron en columnas de Winogradsky durante 30 días para obtener los consorcios de bacterias sulfato reductoras, los cuales se seleccionaron con base al ennegrecimiento por el sulfuro de plomo formado. La degradación anaerobia del benceno, tolueno y xileno por tres consorcios de bacterias seleccionadas se investigó en microcosmos, determinándose la concentración de sulfatos y aromáticos al final del ensayo. En el lodo residual de tres lagunas anaerobias de la planta de tratamiento de aguas residuales en San José, región Lambayeque se seleccionaron tres consorcios de bacterias sulfato reductoras. La concentración de sulfatos remanentes en la degradación anaerobia osciló entre 23,71ppm, (consorcio BSR-C4 + Benceno) a 73,61ppm (consorcio BSR-C6 + Xileno). La eficiencia del consorcio BSR-C4 en la degradación anaerobia fue de 83,33% con el xileno; 72,14 a 86,03% con el benceno y etilbenceno y 34,64% con el o-xileno.

Palabras clave: Bacterias sulfato reductoras, hidrocarburos aromáticos, microcosmos, degradación anaerobia.

ABSTRACT

To determine the efficiency of reducing sulphate bacteria pools in the anaerobic degradation of petroleum aromatic hydrocarbons in microcosms. The residual mud bacteria were enriched in Winogradsky columns for 30 days to obtain the sulphate-reducing bacteria consortiums, which were selected based on the blackening by the lead sulphide formed. The anaerobic degradation of benzene, toluene and xylene by three consortia of selected bacteria was investigated in microcosms, determining the concentration of sulphates and aromatics at the end of the test. Three consortiums of reducing sulphate bacteria were selected in the residual mud of three anaerobic lagoons of the wastewater treatment plant in San José, Lambayeque region. The concentration of sulfates remaining in the anaerobic degradation ranged from 23.71ppm, (consortia BSR-C4 + Benzene) to 73.61ppm (consortia BSR-C6 + Xylene). The efficiency of the BSR-C4 consortium in the anaerobic degradation was 83.33% in the xylene; 72.14 to 86.03% with benzene and ethylbenzene and 34.64% with o-xylene.

Key words: Sulfate-reducing bacteria, aromatic hydrocarbons, microcosms, anaerobic degradation.

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos totales de petróleo (HTP) impactan negativamente el ambiente y la salud de los seres vivos (Herrera, 2014; Pérez, Viguera, Gómez & Calva, 2015). Entre los HTP están los hidrocarburos aromáticos, HA: monoaromáticos (HMA) y poliaromáticos (PHA). Los HMA contaminan el agua y tierra debido a los derrames accidentales de gasolina o diésel y los PHA contaminan durante la combustión incompleta de la materia orgánica, derrames petroleros y combustión de gasolina o diésel (Villarreal, Balagurusamy, Rodríguez, Aguilar & Morlett, 2014).

El benceno, tolueno, etilbenceno y los isómeros del xileno (BTEX) son monoaromáticos volátiles que se encuentran en el petróleo crudo y derivados como la gasolina y también son producidos a gran escala como materia prima para algunas industrias. La contaminación de los ambientes subterráneos por BTEX es difícil de eliminar porque estos compuestos son relativamente solubles en agua y se difunden rápidamente en los acuíferos (Villatoro, Mesta y Razo, 2002), habiéndose determinado tiempos de residencia de 3 a 10 años (García, 2016).

Las bacterias degradan los hidrocarburos aromáticos en aerobiosis (Pérez et al., 2015); no obstante, el consumo rápido de oxígeno agota este elemento y los ambientes se vuelven anóxicos (Kleinstüber, Schleinitz, Breithfeld, Harms, Richnow & Vogt, 2008). En el suelo, sedimentos de los cuerpos de agua y aguas subterráneas, donde prevalecen las condiciones anóxicas, se requiere la biodegradación anaerobia que puede ser realizada por consorcios de bacterias sulfato reductoras (BSR) además de las fermentativas (acidogénicas y acetogénicas), desnitrificantes, metanogénicas y reductoras del ion férrico (García, 2016).

Los resultados de la presente investigación permitirán validar la tecnología de Biorremediación mediante consorcios de bacterias sulfato reductoras más eficientes en la degradación de hidrocarburos aromáticos del petróleo en anaerobiosis.

Las bacterias sulfato reductoras y degradadoras de los hidrocarburos aromáticos crecen con lentitud, con tiempos promedio de duplicación de 2 semanas y mínima producción de biomasa en los cultivos discontinuos; sin embargo, los estudios moleculares han demostrado las reacciones bioquímicas exitosas para la degradación anaerobia de estos hidrocarburos (Meckenstock, Boll, Mouttaki, Koelschbach, Cunha, Weyrauch, Dong & Himmelberg, 2016). En este contexto, se requiere obtener y caracterizar consorcios de bacterias sulfato reductoras más eficientes en la degradación de hidrocarburos aromáticos del petróleo en anaerobiosis.

El conocimiento sobre la biodegradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo es escaso, por cuanto la investigación se ha centrado básicamente en la biodegradación aerobia; sin embargo, existen muchos ambientes contaminados con estos hidrocarburos que deben ser recuperados con microorganismos previamente caracterizados.

Los resultados de la presente investigación en condiciones de microcosmos contribuirán a la implementación de una tecnología para la biorremediación a mayor escala de suelos y sedimentos anóxicos contaminados con hidrocarburos aromáticos, con la perspectiva de recuperar el suelo y disminuir las fuentes de contaminación para los seres vivos

Problema

¿Cuál es la eficiencia de tres consorcios de bacterias sulfato reductoras en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo en microcosmos?

Hipótesis

La eficiencia de tres consorcios de bacterias sulfato reductoras es mayor de 60% en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo en microcosmos.

Objetivo general

Determinar la eficiencia de consorcios de bacterias sulfato reductoras en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo en microcosmos.

Objetivos específicos

- Seleccionar consorcios de bacterias sulfato reductoras en lodo residual de lagunas anaerobias de tratamiento de aguas residuales.
- Comparar la concentración de sulfatos remanentes en la degradación anaerobia de benceno, tolueno y xileno en microcosmos.
- Determinar la eficiencia de un consorcio de bacterias sulfato reductoras en la degradación anaerobia de benceno, tolueno y xileno en microcosmos.

CAPÍTULO I

ANÁLISIS DEL OBJETO DE ESTUDIO

1.1 Ubicación

Las muestras de lodo residual se colectaron en las tres lagunas anaerobias de la planta de tratamiento de aguas residuales en San José, región Lambayeque (Figura 1). El distrito de San José con una superficie de 46,73 km² está situado a 12,9 km. al Nor Oeste de la ciudad de Chiclayo, entre las coordenadas geográficas 6°47'54 de latitud sur y 79°59'30 de longitud oeste del meridiano de Greenwich (Instituto Nacional de Defensa Civil, 2003).

La planta de tratamiento de efluentes residuales denominada “Lagunas de Estabilización” de San José (Figura 2), se encuentra ubicada en el Km 6 de la carretera Chiclayo-San José, a 500 metros de Ciudad de Dios y fue construida como unidad compacta, para el tratamiento de las aguas residuales drenadas por los colectores Norte, Sur, Norte-Norte de Chiclayo, para una capacidad de 76850 m³día⁻¹, correspondientes a 890 Lsegundo⁻¹. La planta de tratamiento consiste en un canal de ingreso de aguas residuales, dos cámaras de rejas automáticas, un medidor de caudales Parshall, una caja de distribución de caudales, cinco lagunas de estabilización anaerobias primarias de 165 x 122 m y 3,5 m de profundidad, cinco lagunas de estabilización facultativas secundarias de 245 x242 m y 1,80 m de profundidad, una estructura de salida de agua tratada con dos compuertas de control y un canal de derivación de agua tratada a tajo abierto (Cabrera & Orrego, 2014).

1.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación se realizó en dos fases. En la primera fase descriptiva con el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt (Vásquez, Díaz, Vásquez & Vásquez, 2012). se obtuvieron, consorcios de bacterias sulfato reductoras en columnas de Winogradsky y se seleccionaron utilizando benceno, tolueno y xileno como fuentes de carbono.

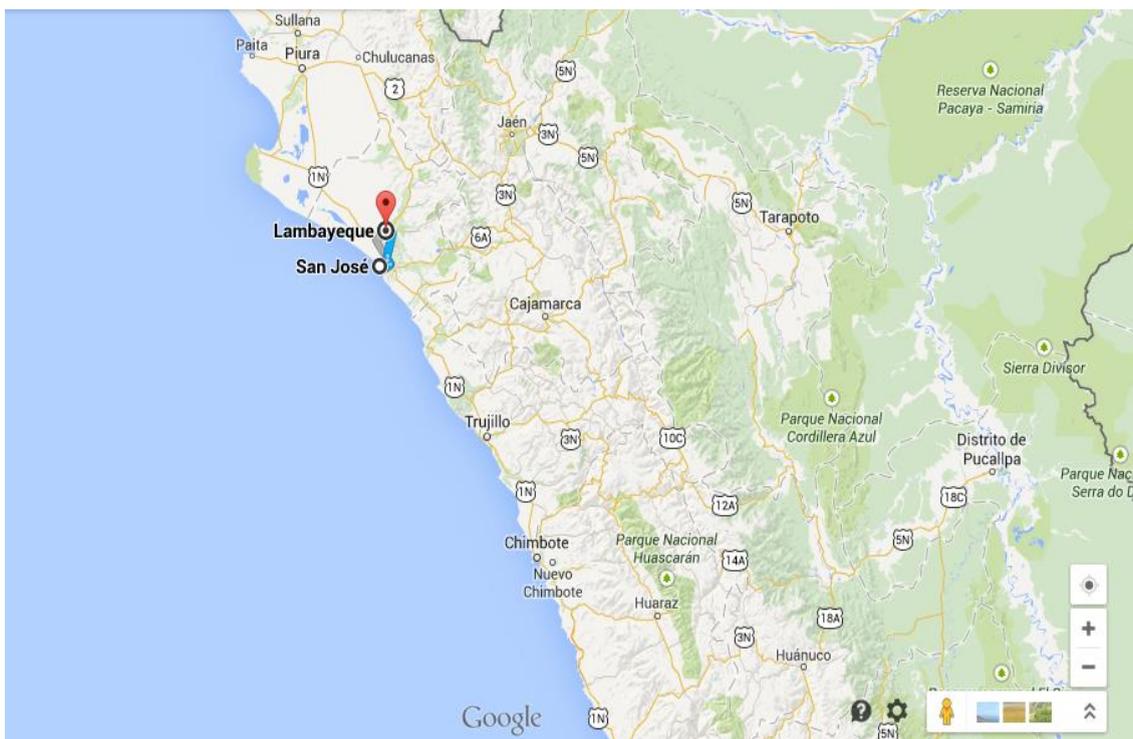


Figura 1. Ubicación del lugar de muestreo en el distrito de San José, provincia Chiclayo, región Lambayeque, 2019.

(<https://maps/dir/San+Jos%C3%A9/Lambayeque/@-es>).

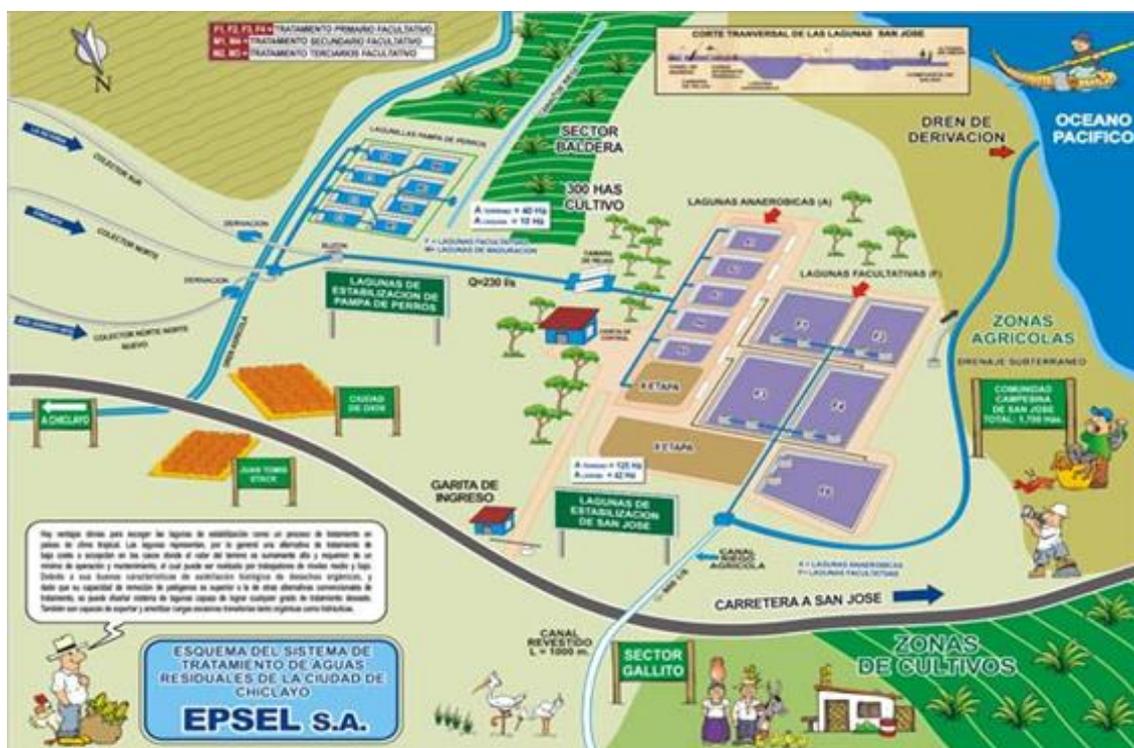


Figura 2. Ubicación de la Laguna de Estabilización de San José en la provincia de Chiclayo, región Lambayeque.

(<http://www.epsel.com.pe/Presentacion/WFrmServicioAL.aspx>).

En la segunda fase experimental con el diseño completamente aleatorizado DCA con arreglo factorial 3x3+3 (Hernández, Fernández & Baptista 2014) se comparó la eficiencia de tres consorcios de bacterias sulfato reductoras en la degradación anaerobia de tres hidrocarburos aromáticos. El factor A correspondió a los hidrocarburos aromáticos (benceno, tolueno, xileno) y el factor B a los consorcios de bacterias (tres consorcios). Los tratamientos fueron nueve, cada uno con tres repeticiones, incluyendo tres testigos sin bacterias con un total de 36 unidades experimentales (Figura 3).

1.3 Población y muestra

La población estuvo constituida por los consorcios de bacterias sulfato reductoras obtenidos de lodo residual y la muestra no probabilística y por conveniencia correspondió a tres consorcios bacterianos.

1.4 Variables

a. Variables de la fase descriptiva

Actividad reductora de sulfato de consorcios de bacterias

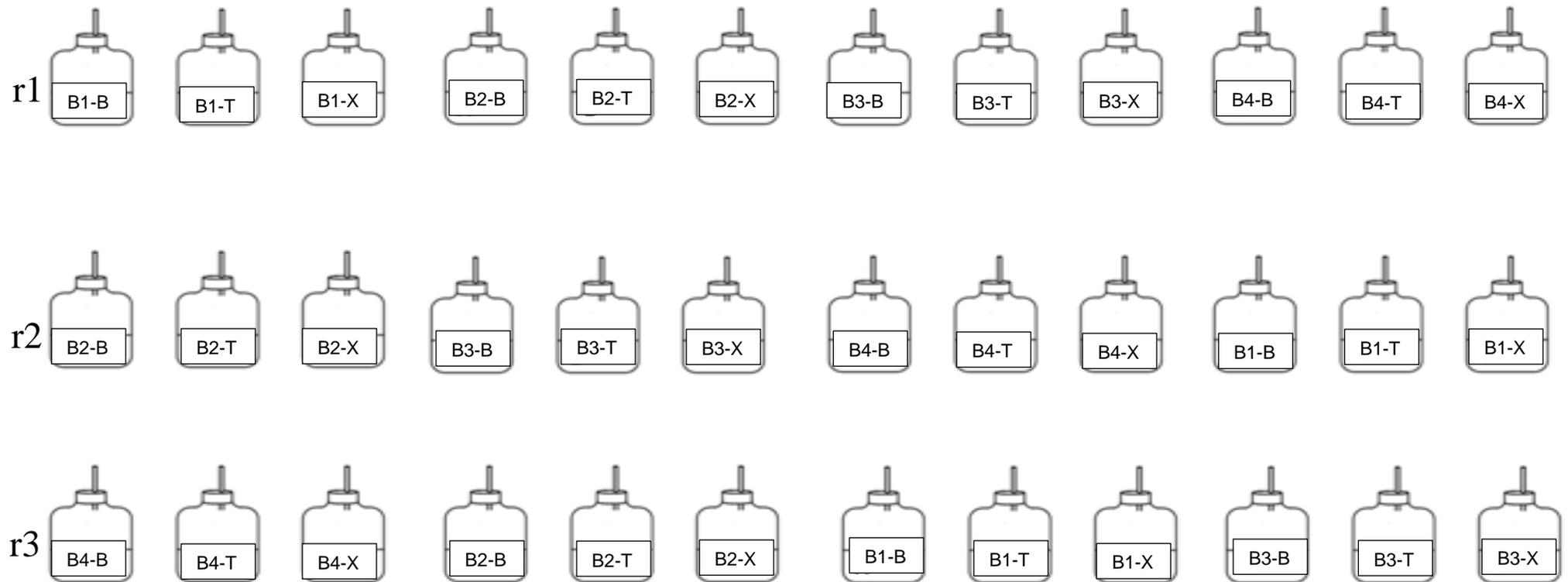
b. Variable de la fase explicativa

Variable independiente: Tres consorcios de bacterias sulfato reductoras

Variable dependiente : Degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo

1.5 Material biológico

Lodo residual, bacterias sulfato reductoras e hidrocarburos aromáticos del petróleo



B1 a B3: Consorcios de bacterias sulfato reductoras

B4 : Tratamiento sin consorcios de bacterias

B: benceno, T: tolueno, X: xileno

Figura 3. Diseño experimental para determinar la eficiencia de consorcios de bacterias sulfato reductoras en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo, 2018.

1.6 Primera fase: Obtención, comparación y selección de consorcios de bacterias sulfato reductoras

Los consorcios de bacterias sulfato reductoras se obtuvieron en diez columnas de Winogradsky y se seleccionaron con base al sulfuro producido utilizando hidrocarburos aromáticos como reductores.

a. Obtención de muestras de lodo residual

En las tres lagunas anaerobias (Figura 4) de la planta de tratamiento de aguas residuales en San José, región Lambayeque, se colectaron diez muestras de lodo residual empleando un recipiente muestreador de 5L, a una profundidad de 1 m por debajo de la superficie (Figura 5). A continuación, 500 mL de cada muestra se transfirieron a frascos de vidrio de boca ancha, debidamente identificados e inmediatamente se transportaron en una caja térmica (10 ± 1 °C), para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo (Figura 6).

b. Enriquecimiento de bacterias sulfato reductoras

Las bacterias sulfato reductoras contenidas en el lodo residual se enriquecieron en diez columnas de Winogradsky (Gutiérrez, Terrazas, & Álvarez, 2007, modificada por Cabrera y Orrego, 2014). Para determinar los componentes requeridos en el armado de las columnas, inicialmente se realizaron los cálculos correspondientes a probetas de 0.5L de capacidad, determinándose un requerimiento de 306,6 mL de lodo residual, 4g de CaCO_3 , 4g de CaHPO_4 , 25g de papel higiénico y dos yemas de huevo cocinado durante 3' (Anexo 1). A continuación, en un balón de vidrio de 3L de capacidad se depositaron 681,4 mL del sobrenadante de lodo residual sedimentado y se mezclaron con 3g de sulfato de sodio (Na_2SO_4), obteniéndose una disolución de sulfato de sodio (Figura 7).

Para obtener lodo enriquecido, en un mortero de 0,5mL de capacidad se depositaron 25g de papel higiénico fragmentado y humedecido en agua potable durante 12 horas y se mezclaron con dos yemas de huevo (Figura 8). El contenido se maceró con 100mL de lodo residual durante 10 minutos y luego se incorporaron las sales de calcio (Figura 9).



Figura 4. Vista aérea de las lagunas anaerobias de estabilización en el distrito de San José, provincia de Chiclayo, región Lambayeque. (<https://maps/dir/San+Jos%C3%A9/Lambayeque/=es>).



Figura 5. Extracción de muestra de lodo residual en laguna anaerobia.



Figura 6. Muestras de lodo residual de planta de tratamiento de aguas residuales.



Figura 7. Mezcla de sobrenadante de lodo residual sedimentado y sulfato de sodio.



Figura 8. Mezcla de papel higiénico con yema de huevo.



Figura 9. Incorporación de sales de calcio a mezcla de lodo residual

En un envase de plástico herméticamente cerrado de 1 galón de capacidad se depositó un cuarto (101,65g) del lodo previamente calculado y se mezcló rápidamente con la preparación del mortero, se añadió el resto de lodo (304,95g), se mezcló y se tapó rápidamente, obteniéndose de esta manera el lodo enriquecido (Figura 10).

Las columnas de Winogradsky constituidas por diez probetas de vidrio de 0,5L de capacidad se lavaron con agua potable y se higienizaron con hipoclorito de sodio comercial 5%, (p/v) durante 12 horas. Con ayuda de una manga de polietileno se depositaron 339,6g de lodo enriquecido (Figura 11) y 150,0g de lodo no enriquecido (Figura 12) correspondientes a 2/3 del volumen útil de la columna y una capa de 10 cm, respectivamente. Cuidadosamente por las paredes de la probeta se vertieron 200,0g de la disolución de sulfato de sodio en agua residual, de tal manera que la probeta se llenó hasta 5cm antes del extremo superior, constituyendo así el volumen útil de la columna de Winogradsky. Después, se depositaron 10mL de aceite comestible formando una capa de 2cm de espesor (Figura 13) y finalmente el extremo superior se selló con parafilm y papel aluminio, para evitar la entrada de aire (Figura 14). Las columnas se incubaron a temperatura ambiente, cerca de una ventana para favorecer la iluminación, durante 30 días.

c. Obtención, comparación y selección de consorcios bacterianos

Para la obtención de consorcios de bacterias sulfato reductoras se tomaron alícuotas de la zona negra de la parte inferior de las columnas de Winogradsky, correspondientes a la región sulfato reductora (Figura 15) y se inocularon en tubos de 50 mL de capacidad (dos tubos/columna), con tapa rosca, conteniendo 10mL de medio Postgate C modificado (Gutierrez et al., 2007), con 1% de etanol (Anexo 2) como fuente de carbono (Figura 16). Después de la incubación, se agregaron en la superficie cuidadosamente 2 mL de aceite esterilizado y los tubos se taparon herméticamente. Transcurrida la incubación a 30°C, durante 30 días (Figura 17), los tubos fueron abiertos y cubiertos inmediatamente con círculos de papel filtro de 1cm de diámetro, humedecidos previamente con una solución de 1 % acetato de plomo, por 15 minutos (Figuras 17, 18).



Figura 10. (A) Lodo residual sin (a) y con enriquecimiento (b).



Figura 11. Adición de lodo enriquecido durante el armado de columna de Winogradsky.

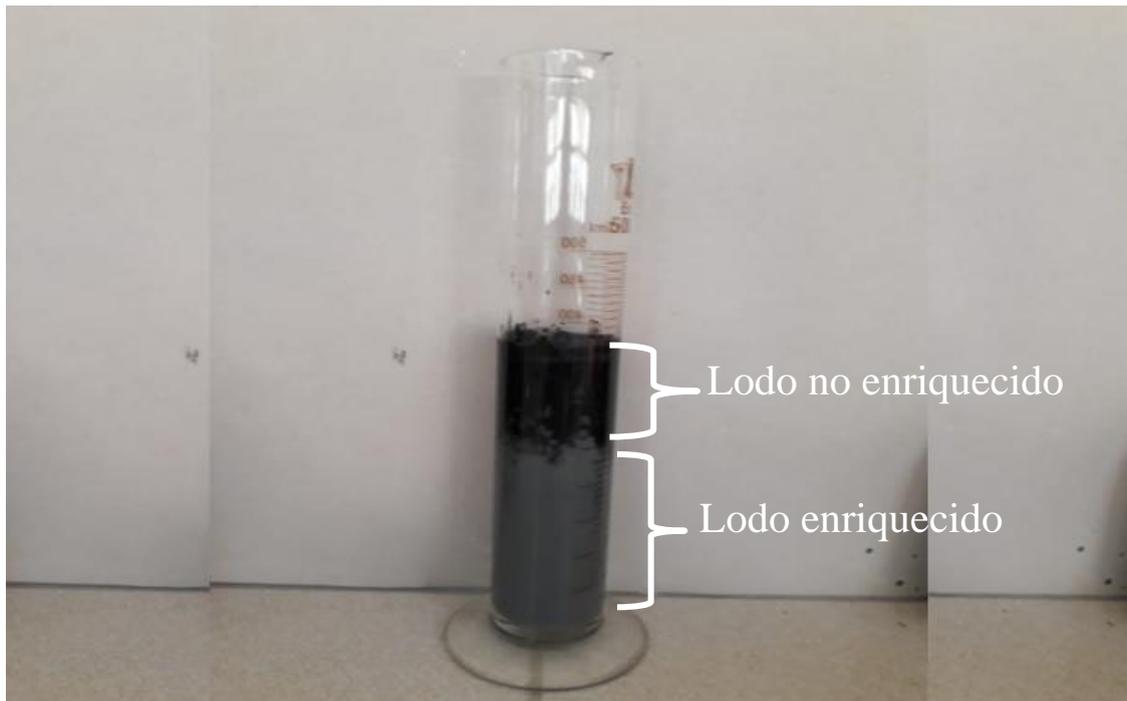


Figura 12. Lodo enriquecido y no enriquecido en columna de Winogradsky.



Figura 13. Película de aceite comestible en extremo superior de columna de Winogradsky.

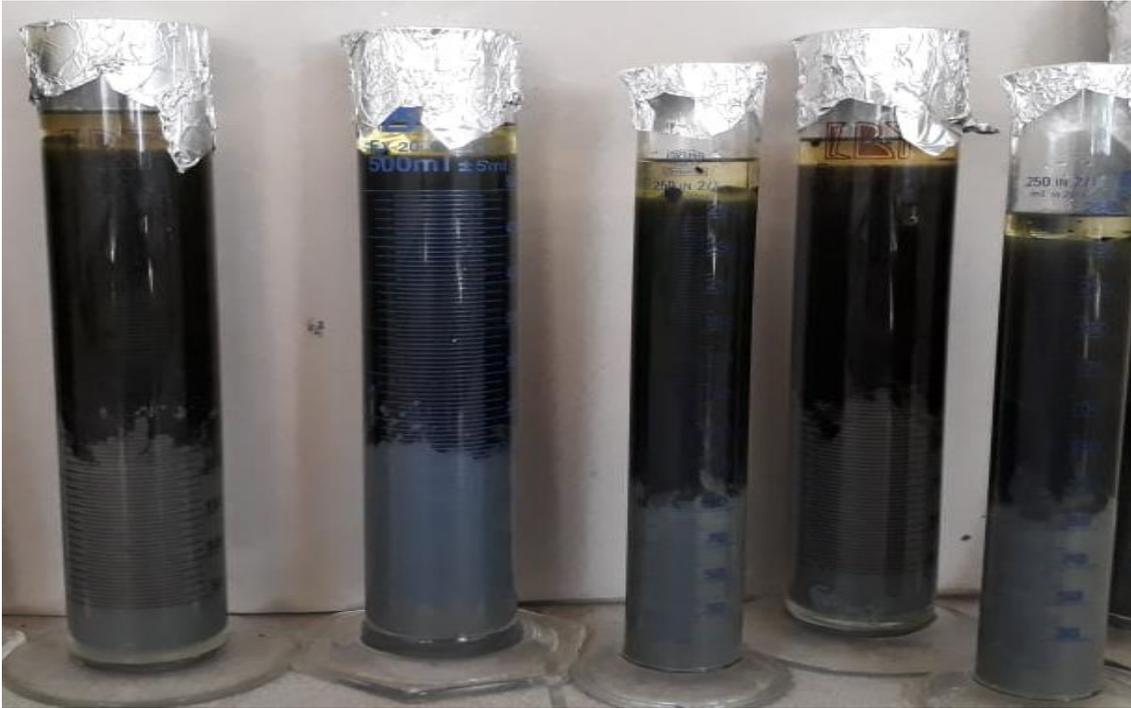


Figura 14. Columnas de Winogradsky selladas con papel aluminio.



Figura 15. Obtención de alícuota de la zona sulfato reductora en la columna de Winogradsky.



Figura 16. Medio Postgate C modificado, para la obtención de consorcios bacterianos.



Figura 17. Medio Postgate C modificado, 30 días después de la inoculación de alícuotas de zona sulfato reductora.



Figura 18. Tubos cubiertos con papel filtro, humedecido en una solución de acetato de plomo.

Transcurridos 15 minutos se realizó la lectura y la presencia de bacterias sulfato reductoras se evidenció por el ennegrecimiento platinado del papel filtro. Este color correspondió al sulfuro de plomo formado y se calificó según una escala convencional (Cabrera & Orrego, 2014): ligero oscurecimiento (+), oscurecimiento (++) , platinado (+++) y negro platinado (++++).

1.7 Segunda fase: Degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo por tres consorcios de bacterias sulfato reductoras

La degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo por tres consorcios de bacterias sulfato reductoras se investigó en microcosmos, determinando la concentración de sulfatos, benceno, tolueno y xileno al final del ensayo.

a. Tratamientos en estudio

El estudio se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 3x3+3. El factor A correspondió a los hidrocarburos aromáticos: benceno (A1), tolueno (A2) y xileno (A3) y el factor B a los consorcios de bacterias sulfato reductoras (B1 a B3), incluyendo un testigo sin bacterias para cada contaminante. Los tratamientos fueron nueve con tres repeticiones y un total de 36 unidades experimentales.

b. Acondicionamiento de microcosmos

Los microcosmos estuvieron constituidos por 36 biorreactores tipo tanque anaerobios, con sistema discontinuo, acondicionados en frascos de vidrio de 0,5 L de capacidad, ajustados a la geometría y proporciones de un biorreactor estándar Guzmán, Hurtado, Carreño y Casos, 2017 (Figuras 19, 20).

El extremo superior de cada biorreactor estuvo cubierto por una tapa de goma, con un orificio, por donde ingresó una manguera de plástico, de 0,5 cm de diámetro, para la salida del H₂S hacia un frasco de 250mL conteniendo 100mL de una solución de acetato de plomo 9,5% p/v. Los frascos de vidrio se esterilizaron en horno (180°C por 2 horas), el material de plástico y goma se sumergieron en hipoclorito de sodio al 5%, durante 24 horas y posteriormente se irradiaron con luz ultravioleta, durante 30 minutos.

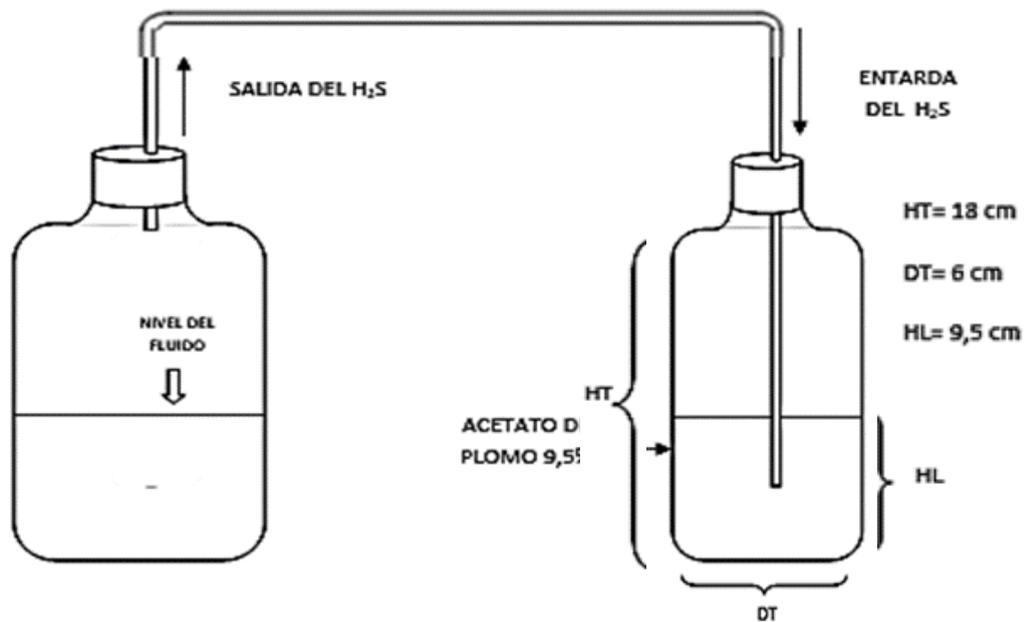


Figura 19. Diseño de biorreactor tipo tanque anaerobio con sistema discontinuo.



Figura 20. Biorreactor tipo tanque anaerobio con sistema discontinuo.

c. Proceso degradativo

En el proceso degradativo se utilizaron los hidrocarburos aromáticos benceno 97% puro (Benzol Z.A., ACS. ISO, E. Merck, D-G100 Darmstadt, F.R, Germany), tolueno 90% puro (Toluol Z.A., ACS. ISO, Merck. KGaA. 64271, Darmstadt, F.R, Germany) y Xileno 89% puro (Xylol Z.A, isomerengemisch, ACS. ISO, Merck. KGaA. 64271).

En los biorreactores o microcosmos, asépticamente se depositaron 100g de papel higiénico fragmentado, remojado en agua destilada durante 24 horas y licuado (procesado). En los microcosmos se vertieron 200 mL de medio de cultivo Postgate C modificado, los hidrocarburos aromáticos (10%:30mL) benceno, tolueno y xileno y el inóculo (3,5%:5.4mL) de cada consorcio de bacterias sulfato reductoras, según el tratamiento correspondiente. Los microcosmos se taparon herméticamente y la manguera plástica se conectó hacia el frasco con la solución de acetato de plomo.

La incubación se realizó a 30°C durante 30 días, tiempo suficiente para observar ennegrecimiento en la manguera, en el acetato de plomo del frasco anexo al biorreactor y en el contenido del biorreactor. La coloración se consideró producto del H₂S formado por las bacterias sulfato reductoras y se calificó cada 10 días mediante una escala convencional propuesta por el investigador: ennegrecimiento tenue del contenido de biorreactor (+), ennegrecimiento acentuado en el contenido del biorreactor (++) y ennegrecimiento acentuado en el contenido y la manguera del biorreactor (+++). Asimismo, a los 30 días se realizaron las diluciones requeridas y se determinó la concentración de sulfatos remanentes en los microcosmos (Anexo 3), mediante el método analítico nefelométrico (Rodier & Rodi, 1981).

En el tratamiento con la menor concentración de sulfatos, a los 30 días se determinó la concentración de hidrocarburos aromáticos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas con extracción purga y trampa. Asimismo, se calculó la eficiencia (%) en la degradación de hidrocarburos aromáticos (Castro & Gonzales, 2003):

$$E = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100$$

Donde:

E = Eficiencia de la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos, HA

S_i = Concentración inicial HA

S_f = Concentración final HA

1.8 Análisis estadístico de los datos

Los valores de la concentración de sulfatos fueron ordenados en tablas para las pruebas de normalidad (Shapiro - Wilk) y homogeneidad de varianzas (Bartlett). Se realizó el análisis de varianza, para determinar las diferencias entre los tratamientos y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para establecer la significancia entre ellos: $p=0,05$ (Hernández et al., 2014). Se utilizaron los programas Microsoft Office Word y Excel 2013.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

La capacidad para mineralizar el fenantreno se investigó en bacterias sulfato reductoras obtenidas de sedimento marino contaminado con hidrocarburos enriquecidas previamente en medio mineral agua de mar y fenantreno (9 mg), con incubación a 31°C en anaerobiosis por 28 semanas y se hicieron subcultivos del enriquecimiento (30% v/v) en el mismo medio. La mineralización del fenantreno determinada por cromatografía de gases como CO₂ y HCO₃⁻ en las fases gaseosa y líquida, respectivamente, varió en 20-45% respecto a los controles. El análisis molecular del enriquecimiento reveló una baja diversidad con el perfil DGGE y el análisis 16S rRNA identificó δ -Proteobacterias sulfato reductoras. Se determinó la mineralización del fenantreno por las bacterias sulfato reductoras (Davidova, Gieg, Duncan & Suflita, 2007).

La biorremediación anaerobia de un acuífero contaminado con benceno (300 μ M) se investigó en un sistema de columnas de percolación. Un set de cuatro columnas se llenó de arena y el otro con gránulos de lava. Los microcosmos se establecieron por duplicado en botellas con 110 mL de arena proveniente de las columnas experimentales y medio mineral hasta 235 mL; benceno (0,3 mM) como fuente de carbono y energía, dos controles sin sustrato y estériles con arena y medio e incubación a 22°C en oscuridad. El benceno se degradó a una velocidad de 5,22 μ M día⁻¹. La identificación por 16S rRNA determinó que en los gránulos de lava predominaron organismos relacionados con *Magnetobacterium* sp. y en las columnas de arena *Sulfurovum*, evidenciándose que los consorcios bacterianos tienen un rol clave en la biodegradación del benceno (Kleinsteuber et al., 2008).

En un ensayo a nivel de laboratorio se investigó la degradación de benceno por bacterias sulfato reductoras. El sedimento marino se enriqueció en anoxia, en medio agua de mar artificial y benceno (0,7%) a 28°C, sin agitación, por 6 meses. Se cuantificó el sulfuro producido, alcanzando concentraciones de 15 mM en comparación a 5 mM en los controles sin benceno. El análisis 16S rRNA de las biopelículas identificó filotipos relacionados con *Deltaproteobacterias* reductoras de sulfatos, incluyéndose *Desulfobacterium anilinii*, *Desulfobacterium* spp., *Desulfosarcina* spp. y *Desulfotignum* spp. Mediante cromatografía de gases se determinó un consumo de benceno de 0,32 mmol, demostrándose el acoplamiento estequiométrico de la reducción de sulfatos a sulfuros (Musat & Widdel, 2008).

La capacidad para remover hidrocarburos totales de petróleo se investigó en consorcios de microorganismos aerobios y anaerobios. Los consorcios aerobios se obtuvieron inoculando 1 mL del microcosmos en 99 mL de medio Bushnell – Haas con 0,5% de petróleo crudo. Los consorcios anaerobios se obtuvieron del medio fluido tioglicolato previamente cultivado y se inocularon en 50 mL de medio base con 0,5% de petróleo crudo más sulfato de sodio y cloruro férrico. Se obtuvieron 22 consorcios, 14 aerobios y 8 anaerobios. Con los aerobios se cuantificaron $1,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de microorganismos heterótrofos y 6 a 88% de hidrocarbonoclasticos. En los consorcios anaerobios se cuantificaron $1,3 \times 10^8$ a $1,2 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹ de sulfato reductoras. Se alcanzó 27 a 62% de eficiencia de remoción de TPH en aerobiosis y 9 a 36% en anaerobiosis, concluyéndose que ambos consorcios pueden utilizarse para la biorremediación (Salazar, 2010).

La caracterización metagenómica de sedimentos marinos se realizó, con el objetivo de identificar las bacterias hidrocarbonoclasticas. La comunidad microbiana se identificó mediante el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr y la concentración de HTP en los sitios de colecta se determinó mediante la cuantificación gravimétrica y caracterización por espectroscopía de infrarrojo y cromatografía de gases – espectrometría de masas (CG-MS). Las muestras en época de lluvias alcanzaron un máximo de 174 µg/g, superando el límite de concentración para hidrocarburos (70 µg/g) establecido por la UNESCO para sedimentos marinos. En los cromatogramas se identificaron alcanos y

cicloalcanos, lo cual indica contaminación por derivados del petróleo crudo y residuos de gasolina y diésel. El análisis metagenómico identificó *Pseudomonas* y *Geobacter*, con capacidad para degradar los hidrocarburos de petróleo (García, 2016).

Un consorcio microbiano aislado de compost de estiércol vacuno se investigó en la biodegradación de tolueno en un sistema discontinuo. Las muestras se cultivaron por duplicado en 100 mL de medio mineral y 25 mgL⁻¹ de tolueno, pH de 6,85 e incubación por 48 horas a temperatura ambiente. La mayor eficiencia de biodegradación fue de 84% para 100 mgL⁻¹ de tolueno y la tasa de crecimiento máxima observada fue 0,062 h⁻¹. Se identificaron *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Escherichia coli* como bacterias dominantes en el cultivo mixto. Se demostró el potencial biodegradador de un cultivo mixto aclimatado para utilizar tolueno en un sistema discontinuo (Rajamanickam, Kaliyamoorthi, Ramachandran, Baskaran & Krishnan, 2016).

La efectividad de las bacterias sulfato reductoras se investigó en la degradación simultánea de tolueno y cobre en microcosmos con agua subterránea. En los microcosmos se aplicó tolueno (175,5 mg/L), cobre (12 mg/L) y el inóculo microbiano de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo y lodo proveniente del tratamiento de aguas residuales. En promedio 99% del tolueno y cobre fue removido durante 40 días. Bajo condiciones de reducción de sulfatos el tolueno fue biodegradado con un consumo de 0,105 g/L de sulfatos, el cobre fue removido por bioprecipitación y la caracterización molecular identificó 12 especies de bacterias sulfato reductoras, demostrándose su efectividad para remover metales pesados e hidrocarburos de petróleo contaminantes de aguas (Huang, Dong, Chen, Surampalli & Kao, 2017)

2.2 Base teórica

Las bacterias sulfato reductoras, BSR, son anaerobios obligados que reducen el sulfato, sulfito o tiosulfato, utilizándolos como aceptores de electrones con producción de H₂S como residuo metabólico, en una respiración anaerobia o reducción desasimilativa. El grupo I de bacterias no oxidantes del acetato, realiza una oxidación incompleta de los sustratos orgánicos lactato,

formiato, propionato, butirato, piruvato e inorgánicos como el hidrógeno molecular, teniendo como producto final acetato. Se incluyen *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonas* y *Desulfolobus*. El grupo II en su mayoría con capacidad oxidantes del acetato, de crecimiento autotrófico, oxidan los ácidos grasos, hasta dióxido de carbono e incluye a *Desulfococcus*, *Desulfobacterium*, *Desulfonema* y *Desulfosarcina*. (Nina, 2008).

Los mecanismos bioenergéticos de la reducción desasimilatoria del sulfato son tres: activación del sulfato y reducción a bisulfito, reducción a sulfuro y metabolismo del hidrógeno. El sulfato es activado por la enzima ATP sulfurilasa que forma adenil sulfato, (APS) y pirofosfato, (PPi). Una segunda enzima, pirofosfatasa, hidroliza PPi, originando Pi. La reducción del APS a AMP y bisulfito es catalizada por los APS reductasa. La reducción de bisulfito a sulfuro se lleva a cabo por dos mecanismos. El primero involucra la reducción de seis electrones de bisulfito a H₂S. En el segundo mecanismo, el bisulfito es reducido a bisulfuro, con intermediarios libres entre el tritionato y el tiosulfato. Las hidrogenasas catalizan la oxidación reversible del hidrógeno molecular a protones y electrones, generando potencial de membrana y gradiente transmembrana de pH, con el bombeo de protones a través de la membrana celular (Fauque & Ollivier, 2004).

La biodegradación anaerobia es un proceso alternativo y efectivo para el tratamiento de diferentes residuos orgánicos incluyendo los hidrocarburos aromáticos, HA (Villarreal et al., 2014). La degradación anaerobia de aromáticos como el benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) ha sido reportada en condiciones de metanogénesis, reducción de sulfatos, nitratos, Fe (III) y Mn (IV). Esta biodegradación es importante en sedimentos de los cuerpos de agua, suelos y aguas subterráneas (Villatoro et al., 2002).

En la degradación bacteriana de HA en anaerobiosis, el oxígeno molecular no puede ser incorporado al anillo aromático y los aceptores de electrones alternativos son los nitratos (NO₃⁻), manganeso (Mn⁴⁺), férrico (Fe³⁺), sulfatos (SO₄²⁻) y dióxido de carbono (CO₂). En términos energéticos en la degradación anaerobia de HAP utilizando nitrato y Fe (III) los microorganismos

conservan más energía, por lo que la eficiencia es similar a la degradación con oxígeno como aceptor final de electrones (Villatoro et al., 2002).

Las bacterias fermentativas también pueden degradar HAP, pero el proceso es viable energéticamente cuando las metanogénicas o las sulfato reductoras consumen los productos finales de su metabolismo. Asimismo, las rutas bioquímicas degradativas son más exigentes de energía en los anaerobios facultativos como las bacterias desnitrificantes en comparación con los anaerobios obligados sulfato reductores y facultativos (García, 2016).

La degradación anaerobia de HA comienza con la activación inicial mediante la adición del fumarato, metilación, hidroxilación de un sustituyente alquilo mediante una deshidrogenasa y carboxilación directa. A continuación, los HA son reducidos mediante la vía del fumarato o por la vía del Benzoil - CoA (Villarreal et al., 2014; García, 2016). Los compuestos aromáticos previamente activados como alquil monoaromáticos y aromáticos no saturados son reducidos en la vía del fumarato por acción de la enzima benzoil succinato sintetasa con formación del intermediario central con fumarato como radical.

En la vía del Benzoil CoA los hidrocarburos aromáticos previamente activados son convertidos a los intermediarios centrales del catabolismo: benzoato o benzoil CoA, hidroxihidroquinona, floroglucinol y resorcinol (enzimas benzoil CoA ligasa y benzoil CoA reductasa). Estos intermediarios sufren una reacción de β oxidación o degradan el Benzoil CoA mediante las vías pimílica y adípica. Se forma acetil CoA, ácidos grasos y pimelil CoA que serán convertidos en CO_2 , H_2 y CH_4 (Villarreal et al., 2014).

Bajo condiciones de reducción de sulfatos, el benceno es transformado a benzoato, un metabolito central más fenol y posteriormente se detectan ácidos alifáticos y productos mineralizados. El tolueno es el alquilbenceno más fácil de degradar en anaerobiosis. El primer paso es la formación del bencilsuccinato, continúa la hidratación de la 2-carboximetil-3-hidroxi-fenilpropionil-CoA, la oxidación a benzoil-succinil-CoA y la ruptura a benzolil-CoA y succinil-CoA. (Villatoro et al., 2002).

En la degradación del m-xileno se ha reportado acumulación de 3-metilbenzoato, indicando que es el mismo paso inicial de la degradación del tolueno. Entre los isómeros orto y para del xileno, el o-xileno es el de más difícil degradación. Los tres isómeros son degradados en presencia de tolueno, es decir por cometabolismo, en sus correspondientes metilbenzoato. Las bacterias degradadoras de aromáticos policíclicos en anaerobiosis crecen lentamente debido a la poca energía conservada durante la oxidación de este contaminante (Tabla 1) en ausencia del oxígeno molecular (Meckenstock et al., 2016):

Tabla 1

Cambios estándar de energía libre y cálculo de la posible síntesis de ATP por mol de hidrocarburos aromáticos oxidados a CO₂ con diferentes aceptores de

Electron acceptors, oxidized/reduced ^b	Stoichiometric equation Ecuación estequiométrica	ΔG° , kJ ^a	Estimated ATP, mol ^c
<i>Benzene</i>			
CO ₂ /CH ₄	C ₆ H ₆ + 10.5 H ₂ O + 3.75 CO ₂ → 6 HCO ₃ ⁻ + 3.75 CH ₄ + 6 H ⁺	-106	1.5
SO ₄ ²⁻ /HS ⁻	C ₆ H ₆ + 3 H ₂ O + 3.75 SO ₄ ²⁻ → 6 HCO ₃ ⁻ + 3.75 HS ⁻ + 2.25 H ⁺	-186	2.7
Ferrihydrite/Fe ²⁺	C ₆ H ₆ + 30 Fe(OH) ₃ → 6 HCO ₃ ⁻ + 30 Fe ²⁺ + 18 H ₂ O + 54 OH ⁻	-525 to -1,104	7.5 - 15.8
MnO ₂ /Mn ²⁺	C ₆ H ₆ + 15 MnO ₂ + 24 H ⁺ → 6 HCO ₃ ⁻ + 15 Mn ²⁺ + 12 H ₂ O	-2,104	30.1
NO ₃ ⁻ /N ₂	C ₆ H ₆ + 6 NO ₃ ⁻ → 6 HCO ₃ ⁻ + 3 N ₂	-2,978	42.5
<i>Naphthalene</i>			
S ⁰ /HS ⁻	C ₁₀ H ₈ + 30 H ₂ O + 24 S → 24 HS ⁻ + 10 HCO ₃ ⁻ + 34 H ⁺	-40	0.6
CO ₂ /CH ₄	C ₁₀ H ₈ + 18 H ₂ O + 6 CO ₂ → 10 HCO ₃ ⁻ + 6 CH ₄ + 10 H ⁺	-157	1.2
SO ₄ ²⁻ /HS ⁻	C ₁₀ H ₈ + 6 SO ₄ ²⁻ + 6 H ₂ O → 10 HCO ₃ ⁻ + 6 HS ⁻ + 4 H ⁺	-286	4.1
Ferrihydrite/Fe ²⁺	C ₁₀ H ₈ + 48 Fe(OH) ₃ → 10 HCO ₃ ⁻ + 48 Fe ²⁺ + 28 H ₂ O + 86 OH ⁻	-828 to -1,754	11.9 - 25.1
MnO ₂ /Mn ²⁺	C ₁₀ H ₈ + 24 MnO ₂ + 38 H ⁺ → 10 HCO ₃ ⁻ + 24 Mn ²⁺ + 18 H ₂ O	-3,355	47.9
NO ₃ ⁻ /N ₂	C ₁₀ H ₈ + 1.2 H ₂ O + 9.6 NO ₃ ⁻ → 10 HCO ₃ ⁻ + 0.4 H ⁺ + 4.8 N ₂	-4,752	67.9
<i>2-Methylnaphthalene</i>			
SO ₄ ²⁻ /HS ⁻	C ₁₁ H ₁₀ + 6.75 SO ₄ ²⁻ + 6 H ₂ O → 11 HCO ₃ ⁻ + 6.75 HS ⁻ + 4.25 H ⁺	-287	4.1
Ferrihydrite/Fe ²⁺	C ₁₁ H ₁₀ + 54 Fe(OH) ₃ → 11 HCO ₃ ⁻ + 54 Fe ²⁺ + 32 H ₂ O + 97 OH ⁻	-896 to -1,938	12.8 - 27.7
<i>Phenanthrene</i>			
SO ₄ ²⁻ /HS ⁻	C ₁₄ H ₁₀ + 8.25 SO ₄ ²⁻ + 9 H ₂ O → 14 HCO ₃ ⁻ + 8.25 HS ⁻ + 5.75 H ⁺	-341	4.9

electrones

Fuente: Meckenstock et al. (2016).

En una revisión de investigaciones en la biodegradación de HA se encontró un rango de 20 a 100% en la eficiencia de remoción de tolueno (Rajamanickam et al., 2016; Huang *et al.*; 2017), benceno (Musat & Widdel, 2008; Meckenstock et al., 2016), naftaleno (Morasch, Höhener & Hunkeler, 2007), fenantreno (Davidova *et al.*, 2007) y fluoreno (García, 2016) en un tiempo de 21 a 220 días utilizando consorcios de bacterias sulfato reductoras como *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobacter* y *Desulfolobus*.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1 Consorcios de bacterias sulfato reductoras obtenidos de lodo residual

Los consorcios bacterianos sulfato reductores se obtuvieron de la zona sulfato reductora en las columnas de Winogradsky. Inmediatamente después del armado, se observaron tres zonas diferenciadas: 2/5 de color grisáceo, correspondientes al lodo enriquecido o zona anaerobia, 1/5 de color negro del lodo residual o zona microaerófila y 2/5 del líquido turbio del sobrenadante del lodo sedimentado o zona aerobia (Figura 21).

Transcurridos 2 días después del armado de las columnas, se observó un burbujeo ascendente, que desapareció gradualmente hasta los 30 días. En simultáneo al burbujeo, en la zona aerobia de cuatro columnas, a los 7 días del armado el color turbio de la zona aerobia cambió por una coloración verdosa que se acentuó y mantuvo durante 20 días (Figuras 22, 23). En las seis columnas restantes la zona aerobia se mantuvo turbia, con tonalidades amarillentas o rojizas (Figuras 24, 25).

En la zona microaerófila de todas las columnas después de 10 días del armado, se observaron manchas rojas y anaranjadas, siendo el color más acentuado en las partes de las columnas con exposición directa a la radiación solar (Figuras 26, 27). El día 15 se observaron pigmentaciones rojas, anaranjadas y púrpuras entre las zonas microaerófila y anaerobia (Figuras 28 a 32). Posteriormente, la pigmentación roja predominó en la zona microaerófila (Figura 33), microaerófila y aerobia (Figura 34) y en toda la columna (Figura 35).

Transcurridos 30 y 40 días después del armado de la columna se observó una pigmentación verdosa en la base de la zona microaerófila (Figura 36).

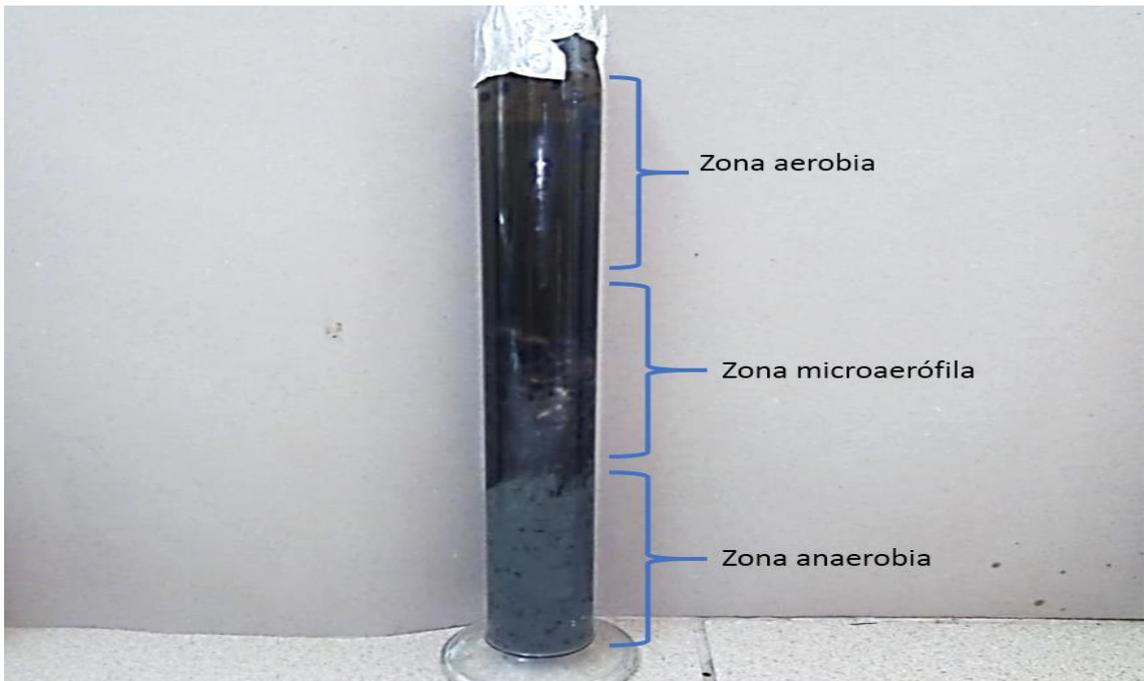


Figura 21. Zonas diferenciadas en la columna de Winogradsky.



Figura 22. Coloración verdosa tenue en la zona aerobia de la columna de Winogradsky.

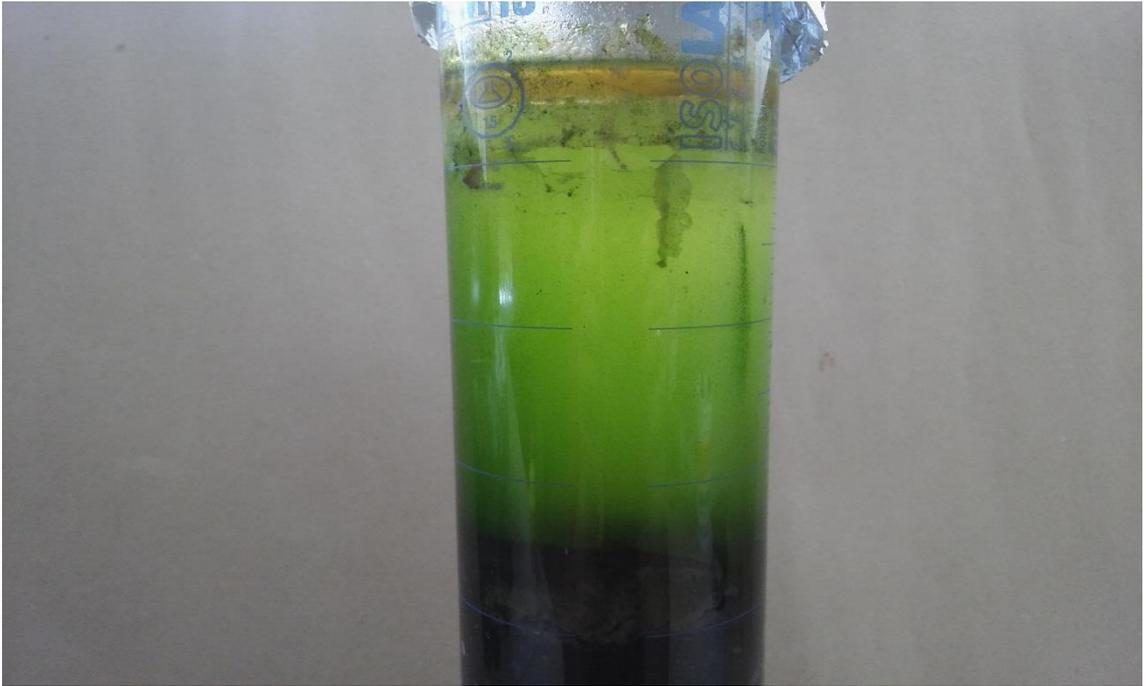


Figura 23. Coloración verdosa acentuada en la zona aerobia de la columna de Winogradsky.



Figura 24. Coloración amarillenta en la zona aerobia de la columna de Winogradsky.



Figura 25. Coloración rojiza en la zona aerobia de la columna de Winogradsky.



Figura 26. Manchas rojas y anaranjadas en la zona microaerófila de la columna de Winogradsky.



Figura 27. Manchas rojas en la zona microaerófila de la columna de Winogradsky.



Figura 28. Pigmentación púrpura en la zona microaerófila de la columna de Winogradsky.



Figura 29. Pigmentación roja y anaranjada en la zona microaerófila de la columna de Winogradsky.



Figura 30. Pigmentación roja y anaranjada en la zona anaerobia de la columna de Winogradsky.



Figura 31. Pigmentación anaranjada en la zona microaerófila de la columna de Winogradsky.



Figura 32. Pigmentación roja y anaranjada en la zona anaerobia y microaerófila de la columna de Winogradsky.



Figura 33. Pigmentación roja en la zona microaerófila de la columna de Winogradsky.



Figura 34. Pigmentación roja en la zona microaerófila y aerobia de la columna de Winogradsky.



Figura 35. Pigmentación roja en toda la columna de Winogradsky.



Figura 36. Pigmentación verdosa encima de la zona anaerobia y debajo de la microaerófila de la columna de Winogradsky.

En simultáneo con la pigmentación verdosa en la base de la zona microaerófila, apareció una pigmentación púrpura (Figura 37) con puntos blancos en la parte superior de la zona anaerobia. Estos puntos en un inicio se observaron en forma aislada y luego como una masa blanca (Figuras 38, 39) que después se volvió negra en el 60% (6) de las columnas de Winogradsky (Figura 40).

El ennegrecimiento se inició como un punto oscuro, que se fue agrandando poco a poco, diferenciándose en determinado momento círculos negros con halos blancos. En las seis columnas de Winogradsky de 40 días, donde se observaron las zonas ennegrecidas correspondientes a las zonas sulfato reductoras, se tomaron 60 alícuotas (diez por columna) que se sembraron en tubos con medio Postgate C modificado con 1% de etanol como fuente de carbono para la obtención de los consorcios de bacterias sulfato reductoras. Transcurridos 30 días, la presencia de estas bacterias se evidenció con el color negro platinado (++++) en 43 de los tubos, con el platinado (+++) en seis tubos, con el oscurecimiento (++) en cinco tubos y con un ligero oscurecimiento (+) en seis tubos (Figuras 41, 42).

Los tres consorcios de bacterias sulfato reductoras seleccionadas correspondieron a los 30 tubos donde se observó el color negro platinado, consorcios procedentes de las columnas de Winogradsky 2, 4 y 6 (Figura 43, tabla 2).

3.2 Comparación de la concentración de sulfatos remanentes en la degradación anaerobia de benceno, tolueno y xileno en microcosmos

La degradación anaerobia de los aromáticos por las bacterias sulfato reductoras se evidenció con el ennegrecimiento del contenido de los biorreactores, de la manguera del sistema anexo o de ambos. No se observó ennegrecimiento en los testigos (Figuras 44 a 47). Transcurridos 10 días en la degradación se observó (Tabla 3) ennegrecimiento tenue (+) en el 7,4% (2) de los microcosmos, ennegrecimiento acentuado (++) en el 33,3% (9) y ennegrecimiento acentuado en el contenido y manguera del sistema anexo en el 3,7% (1).

A los 20 días de incubación se observó (Figuras 48 a 51, tabla 4) ennegrecimiento tenue (+) en el 14,8% (4) de los microcosmos,

ennegrecimiento acentuado (++) en el 44,4% (12) y ennegrecimiento acentuado en el contenido y manguera del sistema anexo en el 11,1% (3).

A los 30 días de incubación se observó (Figuras 52 a 55, tabla 5) ennegrecimiento tenue (+) en el 29,62% de los microcosmos, ennegrecimiento acentuado (++) en el 44,4% (12) y ennegrecimiento acentuado en el contenido y manguera del sistema anexo en el 22,22% (6).

La concentración de sulfatos remanentes en la degradación anaerobia determinada mediante el método analítico nefelométrico se estimó con la ecuación de regresión $Y=0,0237X+0,0001$, donde se obtuvo un coeficiente de determinación $R^2=0,09828$ (Figura 56, anexo 3). La concentración de sulfatos remanentes (Tabla 6) osciló entre 23,71ppm (consorcio BSR-C4 + benceno) a 75,61ppm (consorcio BSR-C6 + xileno).

La prueba F del análisis de varianza del factorial 3x3 mostró significancia para los factores hidrocarburos aromáticos (A), consorcios de bacterias sulfato reductoras (B) y la interacción de AxB, lo que evidencia que existió efecto de los tratamientos en la concentración de sulfatos remanentes (Tabla 7). La prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha=0,05$) demostró que las menores concentraciones de sulfatos correspondieron al tolueno (Factor A), al consorcio BSR-C4 (Factor B) y en la interacción AxB al benceno-consorcio BSR-C4 (Tablas 8, 9, 10).

3.3 Eficiencia de un consorcio de bacterias sulfato reductoras en la degradación anaerobia de benceno, tolueno y xileno en microcosmos

La concentración de aromáticos remanentes con el consorcio BCR-C4 fue de 16,67ppm con el tolueno; 27,86 y 13,97ppm con el benceno y etilbenceno y 65,36ppm el o-xileno, correspondientes a 83,33; 72,14; 86,03 y 34,64% de eficiencia en la degradación anaerobia (Tabla 11).



Figura 37. Pigmentación púrpura en la zona anaerobia de la columna de Winogradsky.



Figura 38. Puntos blancos en la zona anaerobia de la columna de Winogradsky.

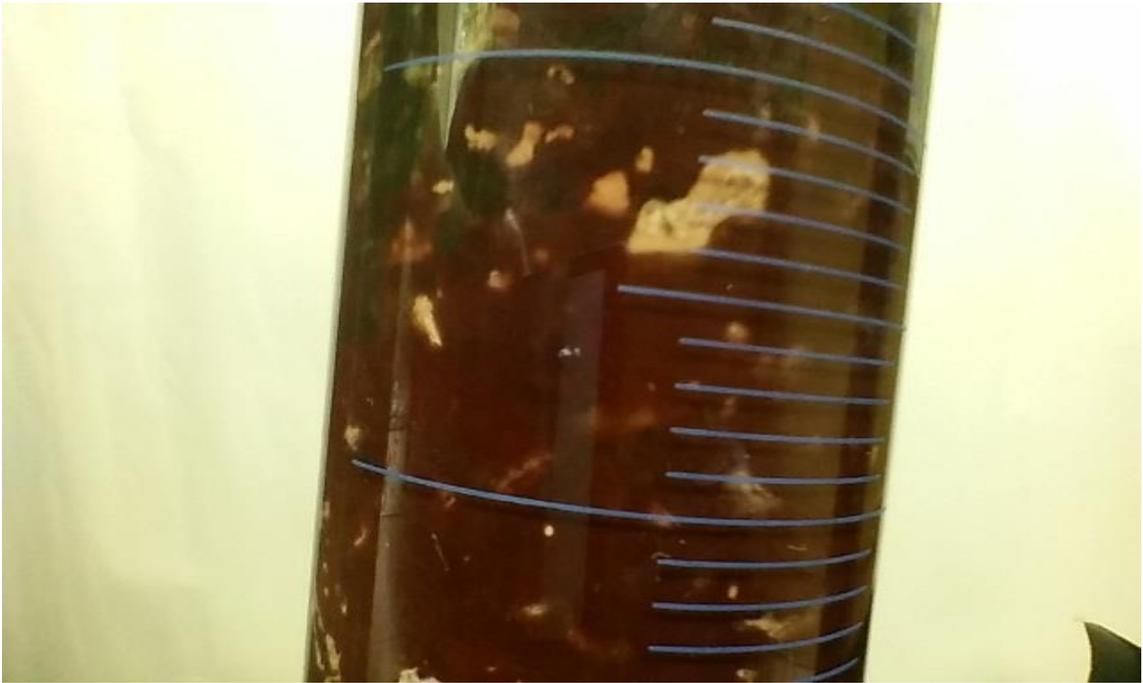


Figura 39. Mancha blanca en la zona anaerobia de la columna de Winogradsky.



Figura 40. Ennegrecimiento en la zona anaerobia de la columna de Winogradsky.

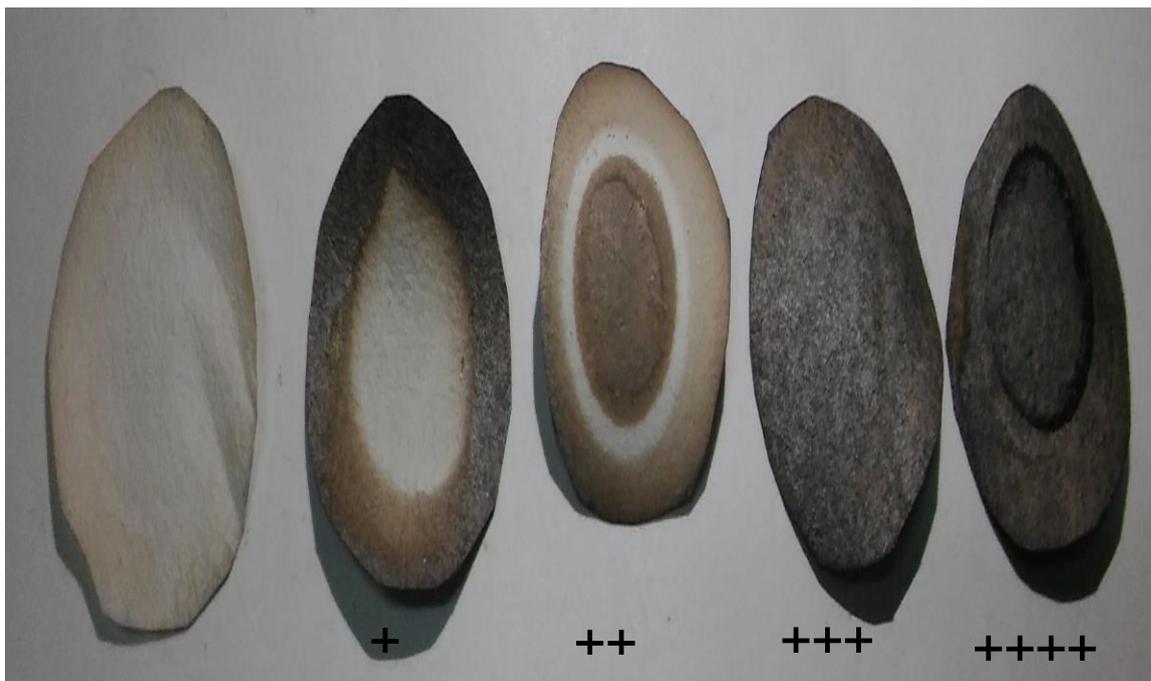


Figura 41. Escala convencional para calificar el sulfuro de plomo en papel filtro: ligero oscurecimiento (+), oscurecimiento (++) , platinado (+++) y negro platinado (++++).



Figura 42. Papel filtro mostrando coloración por el sulfuro de plomo producido por consorcios de bacterias sulfato reductoras.



Figura 43. Coloración negra platinado en papel filtro con sulfuro de plomo producido por consorcios de bacterias sulfato reductoras.

Tabla 2

Sulfuro de plomo producido por consorcios de bacterias sulfato reductoras procedentes de columnas de Winogradsky

Columnas de Winogradsky	Conorcios de bacterias (Nº)			
	++++	+++	++	+
C1	4	2	2	2
C2	10	-	-	-
C3	5	2	1	2
C4	10	-	-	-
C5	4	2	2	2
C6	10	-	-	-
	43	6	5	6



Figura 44. Ennegrecimiento tenue del contenido del biorreactor a los 10 días de incubación.



Figura 45. Ennegrecimiento acentuado en una parte del contenido del biorreactor a los 10 días de incubación.



Figura 46. Ennegrecimiento acentuado en todo del contenido del biorreactor a los 10 días de incubación.



Figura 47. Ennegrecimiento acentuado en el contenido y manguera del sistema anexo del biorreactor a los 10 días de incubación.

Tabla 3

Ennegrecimiento en los biorreactores calificado según escala convencional después de 10 días en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo

Tratamientos	Ennegrecimiento según escala convencional *		
	r1	r2	r3
Consorcio BSR-C2 +Benceno	+	-	-
Consorcio BSR-C4 +Benceno	++	++	-
Consorcio BSR-C6 +Benceno	+	-	-
Consorcio BSR-C2 +Tolueno	-	-	-
Consorcio BSR-C4 +Tolueno	++	++	-
Consorcio BSR-C6 +Tolueno	++	++	-
Consorcio BSR-C2 +Xileno	-	-	-
Consorcio BSR-C4 +Xileno	++	++	-
Consorcio BSR-C6 +Xileno	++	+++	-



Figura 48. Ennegrecimiento acentuado en la parte superior del contenido del biorreactor a los 20 días de incubación.



Figura 49. Ennegrecimiento acentuado en sobre el papel higiénico en el contenido del biorreactor a los 20 días de incubación.



Figura 50. Ennegrecimiento acentuado en todo el contenido del biorreactor a los 20 días de incubación.



Figura 51. Ennegrecimiento acentuado en el contenido y manguera del sistema anexo del biorreactor a los 20 días de incubación.

Tabla 4

Ennegrecimiento en los biorreactores calificado según escala convencional después de 20 días en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo

Tratamientos	Ennegrecimiento según escala convencional *		
	r1	r2	r3
Consorcio BSR-C2 +Benceno	++	-	-
Consorcio BSR-C4 +Benceno	++	+++	-
Consorcio BSR-C6 +Benceno	++	++	-
Consorcio BSR-C2 +Tolueno	+	-	++
Consorcio BSR-C4 +Tolueno	++	++	-
Consorcio BSR-C6 +Tolueno	++	++	-
Consorcio BSR-C2 +Xileno	++	+	+
Consorcio BSR-C4 +Xileno	+++	++	+
Consorcio BSR-C6 +Xileno	++	+++	-



Figura 52. Ennegrecimiento acentuado en el contenido y manguera del sistema anexo del biorreactor a los 30 días de incubación.



Figura 53. Ennegrecimiento acentuado en todo el contenido del biorreactor a los 30 días de incubación.



Figura 54. Película en la superficie del contenido del biorreactor a los 30 días de incubación.



Figura 55. Ennegrecimiento acentuado en el contenido y manguera del sistema anexo del biorreactor, durante la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos de petróleo.

Tabla 5

Ennegrecimiento en los biorreactores calificado según escala convencional después de 30 días en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo

Tratamientos	Ennegrecimiento según escala convencional *		
	r1	r2	r3
Consortio BSR-C2 +Benceno	++	+	-
Consortio BSR-C4 +Benceno	++	+++	-
Consortio BSR-C6 +Benceno	++	++	-
Consortio BSR-C2 +Tolueno	+	-	++
Consortio BSR-C4 +Tolueno	+++	+++	+
Consortio BSR-C6 +Tolueno	++	+++	+
Consortio BSR-C2 +Xileno	++	+	+
Consortio BSR-C4 +Xileno	+++	++	+
Consortio BSR-C6 +Xileno	++	+++	+



Figura 56. Turbidez observada en la cuantificación de sulfatos remanentes en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos de petróleo.

Tabla 6

Concentración (ppm) de sulfatos remanentes en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos del petróleo por tres consorcios de bacterias sulfatoreductoras durante 30 días

Tratamientos	Absorbancia			Absorbancia corregida			SO ₄ (ppm)			\bar{x}
	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	
Consortio BSR-C2 +Tolueno	1,571	1,694	1,625	1,407	1,532	1,465	59,37	64,62	61,79	61,93
Consortio BSR-C4 +Tolueno	0,565	0,527	0,595	0,401	0,365	0,435	16,93	15,38	18,33	16,88
Consortio BSR-C6 +Tolueno	1,670	1,661	1,695	1,506	1,499	1,535	63,55	63,23	64,75	63,84
Consortio BSR-C2 +Benceno	0,972	0,982	0,962	0,808	0,820	0,802	34,10	34,58	33,82	34,16
Consortio BSR-C4 +Benceno	1,471	1,465	1,437	1,307	1,303	1,277	55,15	54,96	53,86	54,66
Consortio BSR-C6 +Benceno	1,688	1,697	1,651	1,524	1,535	1,491	64,31	64,75	62,89	63,98
Consortio BSR-C2 +Xileno	1,281	1,361	1,437	1,117	1,199	1,277	47,14	50,57	53,86	50,52
Consortio BSR-C4 +Xileno	1,689	1,698	1,698	1,525	1,536	1,538	64,35	64,79	64,87	64,67
Consortio BSR-C6 +Xileno	1,789	1,798	1,788	1,627	1,638	1,628	68,63	69,09	68,67	68,80

Tabla 7

Análisis de varianza por los factores hidrocarburos aromáticos y consorcio de bacterias sulfato reductoras en la degradación anaerobia en microcosmos

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Gl	Media Cuadrática	F	p	Sign.
Efectos principales						
Aromáticos (A)	928,25	2	464,13	187,49	<0,0001	**
Consortio BSR (B)	2086,16	2	1043,08	421,37	<0,0001	**
Interacciones de primer orden						
A x B	4099,50	4	1024,87	414,01	<0,0001	**
Error	39,61	16	2,48		<0,0001	

CV= 2,95%

Tabla 8

Prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha=0,05$) para el factor hidrocarburos aromáticos durante la degradación anaerobia en microcosmos

Hidrocarburos aromáticos	Medias	Sign.
Benceno	47,55	a
Tolueno	50,94	b
Xileno	61,33	c

Tabla 9

Prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha=0,05$) para el factor consorcios de bacterias sulfato reductoras durante la degradación anaerobia en microcosmos

Consortios de bacterias sulfato reductoras	Medias	Sign.
BSR-C4	45,41	a
BSR-C2	48,88	b
BSR-C6	65,54	c

Tabla 10

Prueba de la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey ($\alpha=0,05$) para la concentración de sulfatos remanentes en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos por consorcios de bacterias sulfatos reductoras

Hidrocarburos aromáticos	Consortios bacterias sulfato reductoras	Medias	Sign.
Benceno	BSR C4	16,88	a
Tolueno	BSR C2	34,17	b
Xileno	BSR C2	50,53	c
Tolueno	BSR C4	54,66	c
Benceno	BSR C2	61,93	d
Benceno	BSR C6	63,84	d
Tolueno	BSR C6	63,99	d
Xileno	BSR C4	64,67	d e
Xileno	BSR C6	68,80	e

Tabla 11

Concentración de hidrocarburos aromáticos remanentes en los microcosmos al término de la degradación anaerobia por consorcio de bacterias sulfato reductoras C4

Hidrocarburos aromáticos (%)	Concentración (ppm)	Eficiencia* en la degradación anaerobia
Tolueno	16,67	83,33
Benceno	27,86	72,14
Etilbenceno	13,97	86,03
O-Xileno	65,36	34,64

*Concentración inicial $100\text{mL}^{-1}=100\text{ppm}$

3.4 DISCUSIÓN

La obtención de consorcios de bacterias sulfato reductoras en columnas de Winogradsky, coincide con Cabrera & Orrego (2014). La columna de Winogradsky es utilizada para enriquecer diversos procariotas, tanto aerobios como anaerobios, observándose el proceso evolutivo y de adaptación. Una vez establecida la columna, se facilita el desarrollo de una serie de comunidades acuáticas, diferenciadas por el color y relacionadas con la concentración de oxígeno, nutrientes, pH y luz. De esta manera, se obtienen inóculos listos para el aislamiento de consorcios y cultivos puros (López, 2008).

El flujo ascendente de burbujeo desde la zona anaerobia de la columna es explicado por la degradación anaerobia de la materia orgánica, que se transforma en biomasa y compuestos inorgánicos en su mayoría volátiles: metano, dióxido de carbono, amoníaco, nitrógeno molecular y H_2S , con la intervención secuencial de bacterias hidrolíticas y fermentadoras, acetogénicas obligadas, reductoras de hidrógeno, sulfato reductoras consumidoras de hidrógeno, homoacetogénicas, desnitrificantes y metanogénicas (Benavides & Plasencia, 2012).

El color verde de la zona aerobia correspondió a las microalgas y cianobacterias, capaces de capturar el dióxido de carbono, romper la molécula de agua y liberar oxígeno. A su vez, la turbidez en la zona aerobia es explicada por la presencia de bacterias incoloras aerobias quimioautótrofas (*Beggiatoa*, *Thiobacillus*, *Thiothrix*) que oxidan el H_2S , que en parte llega hasta la parte superior de la columna (López, 2008).

Las pigmentaciones rojas, anaranjadas, púrpuras y verdes de la zona microaerófila correspondieron a las bacterias púrpuras y verdes oxidantes del azufre (fotoautótrofas dependientes del azufre), que utilizan el H_2S generado por la descomposición de la materia orgánica y reducción de sulfatos en la zona anaerobia (Moreno, Gorriti, Flores & Albarracin, 2012).

Las bacterias púrpuras y verdes son oxidantes fotosintéticas del azufre que realizan la fotosíntesis no oxigénica, en la que el oxígeno no está implicado. El azufre es oxidado a azufre elemental (S^0), que es almacenado como gránulos en el interior de las células (púrpuras) o en el exterior (verdes). Las bacterias púrpuras del azufre incluyen rodoespiraláceas y cromatiáceas

como *Rhodospirillum* y *Rhodopseudomonas* y presentan una coloración violeta-azulada, púrpura, rojo profundo y marrón anaranjado, debido a los pigmentos fotosintéticos bacterioclorofilas y carotenoidicos (Madigan, Martinko & Parker, 2004). Las bacterias verdes del azufre, representadas por clorobiaceas y cloroflexiáceas como *Chlorobium* spp. deben su color a la bacterioclorofila (Coyne, 2000).

Las bacterias púrpuras y verdes se estratificaron en la zona microaerófila de la columna de Winogradsky, dependiendo de su tolerancia al H₂S: las verdes abajo y las púrpuras encima. Como las bacterias púrpuras del S, las verdes viven en ambientes anaerobios con abundante H₂S y debido a que el clorosoma o estructura que alberga la bacterioclorofila es muy eficiente como recolector de luz se requiere muy poca luz para la fotosíntesis, por lo que normalmente se encuentran a mayores profundidades que el resto de fotótrofos y en la columna de Winogradsky el estrato verde se encuentra por debajo del púrpura (Madigan et al. 2004; Cabrear & Orrego, 2014).

En la parte superior de la zona microaerófila, limitando con la zona aerobia se observaron manchas anaranjadas correspondientes a las bacterias púrpuras no oxidantes del azufre (fotoheterótrofos no dependientes del azufre), que obtienen energía por fotosíntesis anoxigénica, utilizando como fuente de carbono ácidos orgánicos, azúcares o alcoholes y son inhibidas por altas concentraciones de H₂S (López, 2008; Moreno et al., 2012). Las bacterias púrpuras “no del azufre” pueden oxidar el sulfuro; no obstante, no son viables en los niveles de H₂S oxidados por las bacterias púrpuras del azufre, son nutricionalmente muy diversas y la mayoría también puede crecer fotoautotróficamente con dióxido de carbono más hidrógeno o dióxido de carbono más bajos niveles de H₂S (Madigan et al., 2004).

Las bacterias verdes y púrpuras del azufre y púrpuras “no del azufre”, se hicieron más evidentes con la radiación solar directa, porque son fotolitótrofos-autótrofos en el caso de las bacterias verdes y púrpuras del azufre y fotoorganótrofos-heterótrofos en las bacterias púrpuras no del azufre (Madigan et al. 2004). Cuando una columna de Winogradsky se expone a la luz solar o la proporcionada por la incandescencia de un filamento de tungsteno de una lámpara de laboratorio, la luz roja e infrarroja es absorbida por la clorofila y bacterioclorofila, desarrollándose microorganismos fotosintéticos (López, 2008).

Las bacterias púrpuras del azufre fueron más evidentes que las verdes. Se coincide con López (2008), quien manifestó que las bacterias púrpuras, mayoritarias en la columna de Winogradsky, son anaerobias, parcialmente sensibles al oxígeno molecular y sulfuro de hidrógeno y producen compuestos reducidos a partir del dióxido de carbono. De igual manera, Malajovich (2014) mencionó que las bacterias púrpuras crecen antes que las verdes y por encima de ellas, porque son menos exigentes en relación al H₂S. Inclusive en presencia de poco oxígeno, las bacterias desarrollan, llegando a visualizarse en el líquido de la parte superior de la columna.

En la región anaerobia de color negro de las columnas de Winogradsky se obtuvieron consorcios de bacterias sulfato reductoras, coincidiendo con Vierna & Baeza (2010) y Cabrera y Orrego (2014). Estas bacterias se encuentran en ambientes acuáticos y terrestres, que se vuelven anóxicos, debido a los procesos de descomposición. La mejor estudiada es *Desulfovibrio desulfuricans*, común en ambientes acuáticos o en suelos encharcados, con abundante materia orgánica y sulfato. Las bacterias sulfato reductoras utilizan tanto el sulfato (SO₄⁻²) como el azufre (S⁰) como aceptores de electrones, compuestos orgánicos e H₂ como donadores de electrones y producen H₂S al final de la reducción. La coloración negra de la zona sulfato reductora se debe a la precipitación de H₂S con los metales reducidos depositados en el fondo de la columna (López, 2008; Bacchetti, Barroeta y Esteve, 2015).

Los hidrocarburos monoaromáticos como el benceno, tolueno, etilbenceno e isómeros del xileno (BTEX) son contaminantes frecuentes de los sistemas acuáticos, ambientes en los que el oxígeno es un factor limitante para la degradación de una gran cantidad de residuos orgánicos (Abu, Selesi, Jobelius & Meckenstock, 2009). Bajo estas condiciones, los BTEX pueden ser degradados por las bacterias sulfato reductoras (Musat & Wiidel, 2008; Salazar, 2010; Huang et al., 2017), desnitrificantes, reductores de hierro y metanogénicas (Da Silva, Ruiz-Aguilar & Alvarez, 2005).

La degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos se evidenció en el ennegrecimiento del medio, por la producción de sulfuro de hierro, coincidiendo con Kleinstauber *et al.* (2008). Estos investigadores determinaron que el consumo de benceno, fenol, benzoato y tolueno por un consorcio de bacterias reductoras de sulfatos estuvo acoplado a la producción de sulfuro. Al

respecto, Cabrera y Orrego. (2014) concluyeron que el sulfuro de hidrogeno formado puede reaccionar con los iones metálicos produciendo precipitados de sulfuro metálicos.

La ausencia de ennegrecimiento en algunos biorreactores también fue observada por Kleinsteuber et al. (2008), quienes cuantificaron 1,6 mM de sulfuro producidos durante la oxidación del benceno, pero no detectaron sulfuro con el tolueno, probablemente porque éste precipitó como FeS o F_2S sobre las partículas sólidas del biorreactor.

La disminución de sulfato evidenció su utilización biológica como aceptor de electrones en la oxidación de los hidrocarburos aromáticos (Cunningham, Rahme, Hopkins, Lebron & Reinhard, 2001). Los menores valores en la concentración de sulfatos cuantificados con el benceno y tolueno como sustratos evidenciaron la mayor degradación de estos contaminantes por los consorcios de bacterias, en comparación con el xileno. Al respecto, Da Silva et al. (2015) reportaron la degradación de BTEX junto a etanol, en columnas de agua, alcanzando 30% de eficiencia con el xileno, 32% en el benceno y 41% con el tolueno.

La degradación del benceno ha sido demostrada en anaerobiosis (Morasch et al., 2007; Kleinsteuber et al., 2008; Abu et al., 2009); no obstante, este compuesto se comporta como recalcitrante bajo estas condiciones y es el más tóxico de los BTEX (Cunningham et al., 2001; Da Silva et al., 2005). La degradación del xileno por bacterias sulfato reductoras coincide con la investigación de Cunningham et al. (2001), quienes inyectaron sulfato para favorecer la degradación del contaminante por las bacterias reductoras en un acuífero contaminado.

La menor concentración remanente de tolueno después de 30 días demostró el mayor consumo del aromático durante la degradación anaerobia, superando al benceno y xileno. Al respecto, Kleinsteuber et al. (2008) determinaron 450 horas para el consumo de tolueno por un consorcio de bacterias sulfato reductoras, en comparación con 1150 horas requeridas para el benceno. La tasa de degradación fue de $5,22 \mu\text{M dia}^{-1}$ para el benceno y $7,10 \mu\text{M dia}^{-1}$ para el tolueno. A su vez, Da Silva et al. (2005) establecieron a porcentajes de biodegradación de 61 % (o-xileno), 72% (benceno) y 94% (tolueno) utilizando el sulfato como aceptor de electrones.

CONCLUSIONES

- En el lodo residual de tres lagunas anaerobias de la planta de tratamiento de aguas residuales en San José, región Lambayeque se seleccionaron tres consorcios de bacterias sulfato reductoras.
- La concentración de sulfatos remanentes en la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos osciló entre 23,71ppm, en el consorcio BSR-C4 + Benceno a 73,61ppm con el consorcio BSR-C6 + Xileno.
- La eficiencia de el consorcio BSR-C4 en la degradación anaerobia fue de 83,33% en el xileno; 72,14 a 86,03% con el benceno y etilbenceno y 34,64% con el o-xileno.

RECOMENDACIONES

- Identificar a nivel molecular las bacterias del consorcio BSR-C4
- Cuantificar el sulfuro de hidrógeno producido durante la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos por el consorcio BSR-C4.
- Determinar la eficiencia de la degradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos por el consorcio BSR-C4 a nivel de planta piloto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu, N. Selesi, D., Jobelius, C., & Meckenstock, R. U. (2009). Anaerobic benzene degradation by Gram-positive sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(3), 300-311. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00672.x>
- Bacchetti, T., Barroeta, B & Esteve, A. (2015). La columna bioelectrogénica: una herramienta para introducir conceptos de ecología microbiana y electroquímica en la educación secundaria. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*, 12(3), 529-535. doi: <http://dx.doi.org/10-25267/>
- Benavides C. & Plasencia R. (2012). *Caracterización físico-química y biológica del abono líquido "BIOL" obtenido por digestión anaerobia de tres sustratos orgánicos en Jayanca, Lambayeque* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Cabrera, T. & Orrego, S. (2014). *Eficiencia de la producción de sulfuro para la precipitación de fierro en drenaje ácido por consorcios bacterianos sulfato reductores tolerantes a la acidez* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú. Recuperado de: <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/802>
- Castro, M. & Gonzales, F. (2003) *Eficiencia de la biodegradación de cianuro por un consorcio microbiano aislado de aguas superficiales de quebradas que alimentan el río Llaucano, Cajamarca* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Coyne, M. (2000) *Microbiología del Suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid, España. Ed. Paraninfo.
- Cunningham, J. A., Rahme, H., Hopkins, G. D., Lebron, C., & Reinhard, M. (2001). Enhanced in situ bioremediation of BTEX-contaminated groundwater by combined injection of nitrate and sulfate. *Environmental Science & Technology*, 35(8), 1663-1670. doi: 10.1021/es001722t
- Da Silva, M. L., Ruiz-Aguilar, G. M., & Alvarez, P. J. (2005). Enhanced anaerobic biodegradation of BTEX-ethanol mixtures in aquifer columns amended with sulfate, chelated ferric iron or nitrate. *Biodegradation*, 16(2), 105-114. doi.org/10.1007/s10532-004-4897-5

- Davidova, I., Gieg, L., Duncan, K. & Suflita, J. (2007). Anaerobic phenanthrene mineralization by a carboxylating sulfate-reducing bacterial enrichment. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 1, 436-442. doi.org/10.1038/ismej.2007.48
- Fauque, G. & Ollivier, B. (2004) *Anaerobes: The sulfate reducing bacteria as an example metabolic diversity. Microbial Diversity Bioprospecting*, 17, 169-176. doi: 10.1128/9781555817770
- García, I. (2016). *Caracterización metagenómica de sedimentos marinos para la identificación de bacterias con capacidad para degradar hidrocarburos totales del petróleo (HTP)* (tesis de maestría). Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. Recuperado de: https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/469/1/PCER_M_Tesis_2016_Garc%C3%ADa_Sugey.pdf
- Gutiérrez, A., Terrazas, L. & Álvarez, M. (2007). Aislamiento y cultivo de bacterias sulfato reductoras acidófilas para la producción de sulfuro biogénico para la precipitación de metales pesados. *BIOFARBO*, 15, 5-12. Recuperado de: <http://www.scielo.org.bo/pdf/rbfb/v15n1/v15n1a02.pdf>
- Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C. & Casos, I. (2017) *Producción de polihidroxialcanoatos por bacterias halófilas nativas utilizando almidón de cáscaras de Solanun tuberosun L. Scientia Agropecuaria*, 8 (2), 109 – 118. doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.02.03
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2014). *Metodología de la Investigación* (6^{ta} ed.). México: Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.
- Herrera, B. (2014). *Influencia de la aireación en el tratamiento biológico de borras de hidrocarburos* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú. Recuperado de: <http://cybertesis.uni.edu.pe/handle/uni/1284>
- Huang, W., Dong, Ch., Chen, Ch., Surampalli, R. & Kao, Ch. (2017). Application of sulfate reduction mechanisms for the simultaneous biorremediation of toluene and copper contaminated groundwater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 124, 215-222. doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.03.017

- Instituto Nacional de Defensa Civil. (2003). Mapa de Peligros de San José. Recuperado de: http://bvpad.indeci.gob.pe/doc/estudios_CS/Region_lambayeque/lambayeque/sanjose_mp.pdf
- Kleinstauber, S., Schleinitz, K., Breifeld, J., Harms, H., Richnow, H. & Vogt, C. (2008). Molecular characterization of bacterial communities mineralizing benzene under sulfate-reducing conditions, *FEMS Microbiology Ecology*, 66 (1), 143-57. doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00536.x
- López, J. (2008). La columna de Winogradsky un ejemplo de microbiología básica en un laboratorio de educación secundaria. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*, 5(3), 373-376. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/920/92050311.pdf>
- Madigan, M., Martinko J. & Parker, J. (2004) *Biología de los Microorganismos*. 10^{ma} ed. España: Pearson Educación.
- Malajovich M. (2014) *Guía de actividades. Biotecnología: enseñanza y divulgación*. Guía 28. Recuperado de <http://www.bteduc.blo.br>
- Meckenstock, R., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, J., Cunha, P., Weyrauch, P., Dong, X. & Himmelberg, A. (2016). Anaerobic Degradation of Benzene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 26, 92-118. doi.org/10.1159/000441358
- Morasch, B., Höhener, P. & Hunkeler, D. (2007). Evidence for in situ degradation of mono-and polyaromatic hydrocarbons in alluvial sediments based on microcosm experiments with ¹³C-labeled contaminants. *Environmental Pollution*, 148, 739-748. doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.029
- Moreno, J., Gorriti, M., Flores, M & Albarracín, V. (2012) Micología Ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremo. *REDUCA (Biología). Serie Micológica*, 5(5), 94-109. Recuperado de: <http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/966/997>
- Musat, F. & Widdel, F. (2008). Anaerobic degradation of benzene by a marine sulfate-reducing enrichment culture, and cell hybridization of the dominant phylotype. *Environmental Microbiology*, 10(1), 10-19. doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01425.x

- Nina, Ch. (2008). *Evaluación de los métodos químicos y biogénico para el tratamiento de drenaje ácido de mina a escala de laboratorio* (tesis de Maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. Recuperado de: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/802>
- Pérez, J., Viguera, S., Gómez, O. & Calva, G. (2015). Degradación microbiana con BFNA de hidrocarburos aromáticos por bioaumentación en biopilas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46, 416-423. Recuperado de: <https://ojs.cnic.cu/index.php/RevBiol/article/view/67/67>
- Rajamanickam, R., Kaliyamoorthi, K., Ramachandran, N., Baskaran, D. & Krishnan, J. (2016). Batch biodegradation of toluene by mixed microbial consortia and its Kinetics. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 282-288. doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.11.014
- Rodier, J. & Rodi, L. (1981). *Análisis de las aguas*. Barcelona, España: Edición Omega, S.A.
- Salazar, C. (2010). *Evaluación de la remoción de hidrocarburos totales de petróleo a nivel de laboratorio, mediante consorcios de microorganismos seleccionados por su capacidad degradadora, aislados de suelos y aguas contaminados con crudo de la parroquia San Carlos, provincia de Orellana, bajo condiciones aerobias y anaerobias* (tesis de maestría). Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador. Recuperado de: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/544/1/T-ESPE-029619.pdf>
- Vásquez, A., Díaz, N., Vásquez, N. & Vásquez, V. (2012). *Metodología de la Investigación Científica*. Lambayeque, Perú: Oficina de Impresiones y Publicaciones Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo
- Vierna, L. & Baeza, A. (2010) Microelectrodo selectivo de fácil construcción para la determinación de ácido sulfídrico en un sistema microbial. *Revista FABICIB*, 1(14), 52-57. Recuperado de: <https://web.b.ebscohost.com>
- Villarreal, S., Balagurusamy, N., Rodríguez, R., Aguilar, C. & Morlett, J. (2014). Biodegradación Anaerobia de Hidrocarburos Aromáticos Contaminantes del Medio Ambiente y Alimentos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6(11), 28-39. Recuperado de: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%2011/5.pdf>

Villatoro, W., Mesta, A. & Razo, F. (2002). La biodegradación anaerobia de compuestos aromáticos (BETEX). *Biotecnología*, 7(3), 7-21.

ANEXOS

ANEXO 1**Composición de lodo enriquecido para una probeta de 1L de capacidad
(Gutierrez, *et al.*, 2007, modificada por los autores)**

Lodo residual	406,6 g (1/3 de la capacidad útil de probeta)
CaCO ₃	4 g
CaHPO ₄	4 g
Yemas de huevo	2
Papel higiénico	25 g

ANEXO 2**Medio Postgate C modificado****(Gutierrez *et al.*,2007)**

KH ₂ PO ₄	0,5 g
Na ₂ SO ₄	4,5 g
NH ₄ Cl.....	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,06g
CaCl ₂ .6H ₂ O.....	0,06g
Citrato de sodio.....	0,3g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,004g
Agua destilada c.s.p.	1000mL

ANEXO 3

Método nefelométrico para determinar la concentración de sulfatos (Rodier y Rodi, 1981)

Principio

Los sulfatos precipitan en el medio clorhídrico formando sulfato de bario. El preparado así obtenido se estabiliza por medio de una solución de "Tween20" o de polivinil-pirrolidona. Las suspensiones homogéneas se miden en el espectrofotómetro.

Reactivos

- Solución patrón de sulfato sódico de 120 mg/L de SO_4^{2-} :
 - Sulfato sódico anhidro.....0,1775 g
 - Agua destilada hasta enrase.....100mL
- Solución de Ácido clorhídrico 1/10
- Solución de polivinil-pirrolidona o de "Tween20" al 25%
- Solución de cloruro bórico estabilizado:
 - Cloruro bórico.....10g
 - Solución de "Tween 20".....20mL
 - o 0,5mL de solución de polivinil-pirrolidona
 - Agua destilada hasta enrase.....100mL

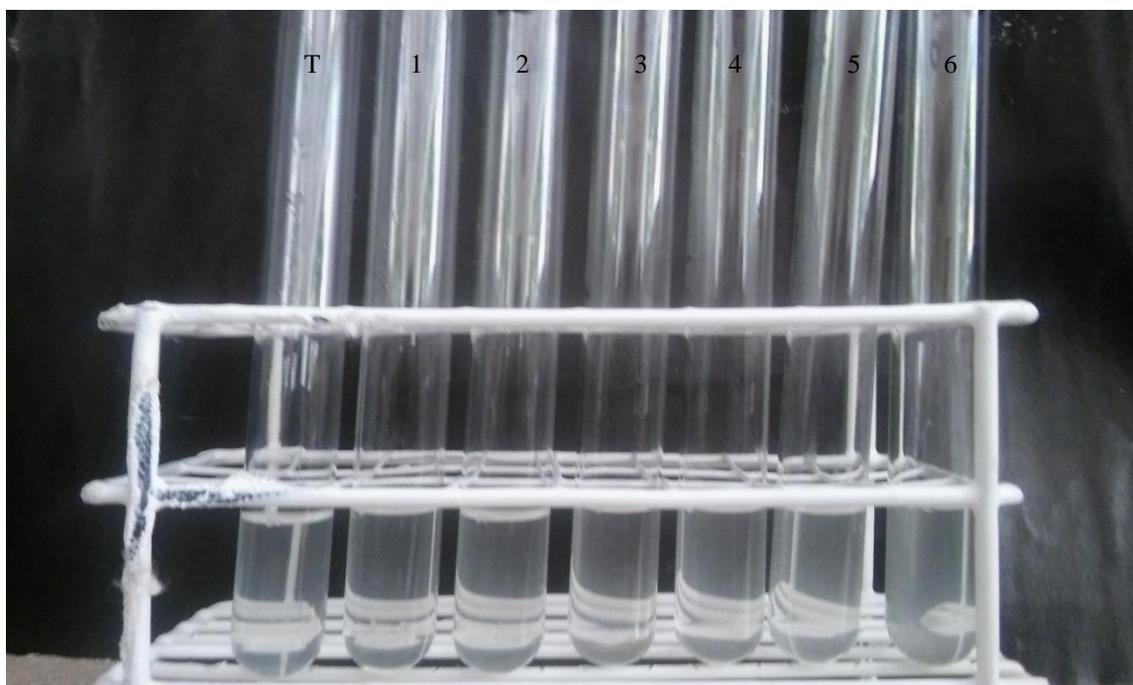
Preparación de la curva de calibrado.

En una serie de tubos de ensayo numerados, introducir sucesivamente:

Solución patrón Nº de tubos	H ₂ O bidestilada SO ₄ (mL)	HCl 1/10 (mL)	Solución BaCl ₂ (mL)	Corresponde estabilizada en mg/L de SO ₄
T	0	3,9	0,1	0,0
1	0,1	3,8	0,1	0,3
2	0,3	3,6	0,1	0,9
3	0,5	3,4	0,1	1,5
4	0,7	3,2	0,1	2,1
5	0,9	3,0	0,1	2,7
6	1,0	2,9	0,1	3,0

Agitar dos o tres veces enérgicamente. Después de 15 minutos de reposo, agitar de nuevo y hacer la lectura en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 650 nm.

Construir la curva de calibración.



Solución patrón para la cuantificación de sulfatos por el Método nefelométrico.

Procedimiento

En un tubo de ensayo, introducir sucesivamente:

Agua a analizar.....39mL

Ácido clorhídrico.....1mL

Solución de cloruro bórico + "Tween20".....5mL

o solución de cloruro bórico + P.V.P

Preparar en las mismas condiciones un testigo reemplazando el agua a analizar por agua destilada. Agitar enérgicamente y dejar en reposo durante 15 minutos. Agitar de nuevo y leer en el espectrofotómetro en una longitud de onda de 650 nm. Tener en cuenta el valor leído para el testigo. Obtener los resultados a partir de la curva de calibración.

Expresión de los resultados

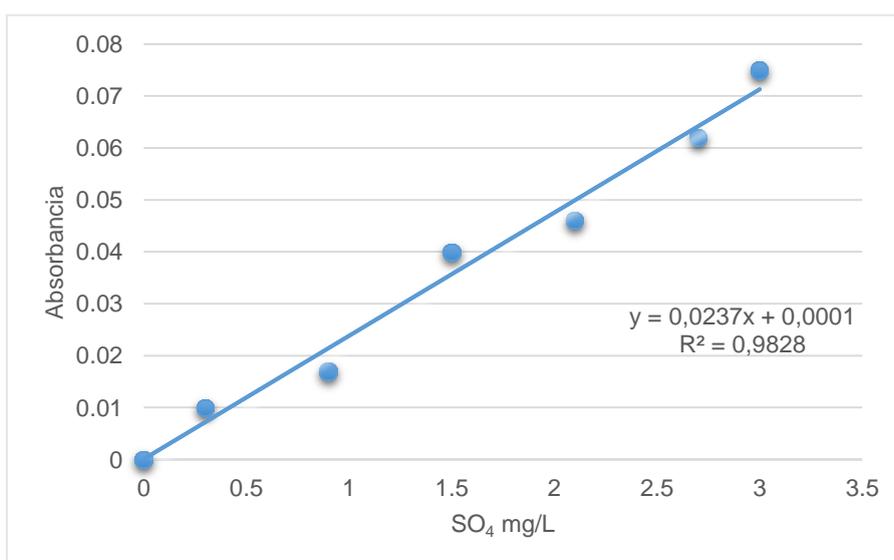
Para una muestra de 39mL, la curva corresponde directamente con el contenido de sulfatos expresado en miligramos de SO_4^- por litro de agua.

Observaciones

El volumen de muestra tomado para el análisis debe contener una cantidad de sulfato inferior a 2 mg. La curva representativa será una recta perfecta para estos contenidos. En el caso de aguas fuertemente cargadas de SO_4^- , preparar las diluciones comprobando cada vez que éstas se encuentren en la zona de utilización de la curva de calibrado.

Cuantificación de sulfatos por el Método nefelométrico

Nº de tubos	Corresponde en mg/L de SO_4	Absorbancia	Absorbancia corregida
T	0,0	0,125	0,000
1	0,3	0,135	0,010
2	0,9	0,142	0,017
3	1,5	0,165	0,040
4	2,1	0,171	0,046
5	2,7	0,187	0,062
6	3,0	0,200	0,075



Curva patrón de calibración de sulfatos

En la ecuación obtenida:

$$y = 0,0237x + 0,0001$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de sulfatos en ppm (variable independiente)

Despejar "x" para obtener la cantidad de sulfato (ppm) producido por cada bacteria.

$$x = \frac{y - 0,0001}{0,0237}$$