

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



**Microorganismos aislados de borras de hidrocarburos en la refinería
de Talara y su potencial para la biorremediación de suelo
contaminado, marzo de 2018**

TESIS

**Presentada para optar el Título Profesional de Licenciado en
Biología - Microbiología – Parasitología**

Autor:

Bach. Roberto Junior Ugaz Llontop

Asesor:

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

Lambayeque, Perú

2019

**Microorganismos aislados de borras de hidrocarburos en
la refinería de Talara y su potencial para la biorremediación
de suelo contaminado, marzo de 2018**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA -
MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

APROBADA POR:

Dr. Wilmer Carbajal Villalta

PRESIDENTE

Lic. Julio César Silva Estela

SECRETARIO

Dr. César García Espinoza

VOCAL

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

ASESORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2019

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes de la investigación	3
2.2 Base teórica.....	6
2.2.1 Borrás.....	7
III. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1 Material	10
3.1.1 Material biológico.....	10
3.1.2 Población y muestra	10
3.2 Métodos	10
3.2.1 Variable cuantitativa	10
3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis	10
3.2.3 Lugar de muestreo y obtención de muestras	10
3.2.4 Determinación de las características químicas, microbiológicas y toxicidad de las borras de hidrocarburos	12
3.2.5 Selección de los microorganismos hidrocarbonoclasticos en borras de hidrocarburos	17
3.2.6 Selección e identificación de los microorganismos hidrocarbonoclasticos productores de surfactante.....	17
3.2.7 Valoración de la producción de surfactantes.....	19
3.2.8 Análisis de los datos.....	26
IV RESULTADOS	30
4.1 Características químicas, microbiológicas y toxicidad de las borras de hidrocarburos	30
4.2 Microorganismos hidrocarbonoclasticos aislados y seleccionados en borras de hidrocarburos	30
4.3 Géneros de microorganismos productores de surfactantes identificados en borras de hidrocarburos	30
4.4 Rendimiento de surfactante en función de la biomasa del microorganismo con el mayor halo de emulsión de TPH.....	40
V. DISCUSIÓN.....	53
VI. CONCLUSIONES	56
VII. RECOMENDACIONES.....	57
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

Índice de figuras

Figura 1.	Ubicación de Refinería Talara de Graña y Montero Petrolera (GMP).....	11
Figura 2.	Muestras de borras de hidrocarburos.....	11
Figura 3.	Borra de hidrocarburos homogenizada.....	13
Figura 4.	Número más probable de microorganismos totales en borras de hidrocarburos.....	13
Figura 5.	Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclásticos en borras de hidrocarburos.....	15
Figura 6.	Prueba de germinación de semillas de <i>Raphanus sativus</i> L.....	15
Figura 7.	Prueba de toxicidad de contaminantes de borras de hidrocarburos	16
Figura 8.	Radículas de <i>Raphanus sativus</i> L. en la prueba de toxicidad.	16
Figura 9.	Caldo Bushnell-Haas cultivado con microorganismos aislados de borras de hidrocarburos.....	18
Figura 10.	Inoculo microbiano en medio mínimo salino Davis con glicerol.....	20
Figura 11.	Microorganismos en medio mínimo salino Davis con glicerol.....	20
Figura 12.	Placas de Petri con agua destilada para la prueba de dispersión de gota.....	21
Figura 13.	Adición de petróleo crudo liviano sobre la superficie de agua destilada.....	21
Figura 14.	Adición de sobrenadante de medio mínimo salino Davis cultivado con microorganismos aislados de borras.....	22
Figura 15.	Halo de emulsión formado sobre la capa de hidrocarburos de petróleo.....	22
Figura 16.	Diseño y modo de operación de biorreactor tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente (Guzmán et al., 2017).....	24
Figura 17.	Biorreactores de tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente.....	26
Figura 18.	Medio mínimo salino Davis cultivado con microorganismos aislados de borras de hidrocarburos de petróleo.....	26

Figura 19.	Placas de Petri con petróleo crudo liviano para la prueba de dispersión de gota.....	28
Figura 20.	Prueba de dispersión de gota por medio mínimo salino Davis cultivado por microorganismos aislados de borras.....	28
Figura 21.	Recuperación de biosurfactante en pera de decantación.....	29
Figura 22.	Bacterias aisladas en agar nutritivo.....	34
Figura 23.	Hongos aislados en agar papa dextrosa.....	34
Figura 24.	Cultivos puros de bacterias en agar tripticasa soya.....	35
Figura 25.	Cultivos puros de hongos en agar papa dextrosa.....	36
Figura 26.	Turbidez en caldo Bushnell – Haas por el crecimiento de microorganismos hidrocarbonoclasticos.....	36
Figura 27.	Halos de emulsión formado sobre la capa de hidrocarburos de petróleo por aislamiento bacteriano 6.	37
Figura 28.	Halos de emulsión formado sobre la capa de hidrocarburos de petróleo por aislamiento de hongo 23.	37
Figura 29.	Aislamiento bacteriano 6 desarrollado en agar nutritivo.....	42
Figura 30.	Aislamiento bacteriano 9 desarrollado en agar nutritivo.....	42
Figura 31.	Pruebas bioquímicas para la identificación fenotípica.....	43
Figura 32.	Hongos filamentosos cultivados en agar papa dextrosa.....	43
Figura 33.	Observación microscópica (400x) de <i>Aspergillus</i> sp.....	44
Figura 34.	Observación microscópica (400x) de <i>Penicillium</i> sp.....	44
Figura 35.	Observación microscópica (400x) de <i>Cunninghamella</i> sp.....	45
Figura 36.	Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por <i>Pseudomonas</i> sp. 6.....	46
Figura 37.	Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por <i>Pseudomonas</i> sp. 9.....	47
Figura 38.	Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por <i>Enterobacter</i> sp. 21.....	47
Figura 39.	Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por <i>Pseudomonas</i> sp. 22.....	48

Figura 40.	Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por <i>Pseudomonas</i> sp. 25.....	48
Figura 41.	Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por <i>Bacillus</i> sp. 27	49
Figura 42.	Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por <i>Bacillus</i> sp. 28	49
Figura 43.	Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por <i>Cunninghamella</i> sp. 21.....	50
Figura 44.	Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de <i>Pseudomonas</i> sp. 6 productora de surfactante.....	51
Figura 45.	Biosurfactante producido por <i>Pseudomonas</i> sp. 6.....	52

Índice de tablas

Tabla 1.	Características químicas de borras de hidrocarburos de petróleo de Refinería Graña y Montero Petrolera (GMP) en Talara, Piura, 2019.....	31
Tabla 2.	Número más probable de microorganismos totales e hidrocarbonoclasticos en borras de hidrocarburos de petróleo, procedentes de Refinería Graña y Montero Petrolera (GMP) en Talara, Piura, 2019.....	32
Tabla 3.	Nivel de toxicidad de borras de hidrocarburos de petróleo procedentes de Refinería Graña y Montero Petrolera (GMP) en Talara, Piura, 2019.....	33
Tabla 4.	Microorganismos aislados de borras de hidrocarburos de petróleo procedentes de Refinería Graña y Montero Petrolera (GMP) en Talara, Piura, 2019.....	35
Tabla 5.	Diámetro de los halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo producidos por bacterias hidrocarbonoclasticas.....	38
Tabla 6.	Diámetro de los halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo producidos por hongos hidrocarbonoclasticos.....	39
Tabla 7.	Características diferenciales de bacterias Gram positivas productoras de surfactantes.....	41
Tabla 8.	Características diferenciales de bacterias Gram negativas productoras de surfactantes.....	41
Tabla 9.	Diámetro de los halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo producidos por diez microorganismos hidrocarbonoclasticos seleccionados.....	45
Tabla 10.	Diámetro de los halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo producidos por diez microorganismos en biorreactores tipo tanque con sistema discontinuo.....	46

Tabla 11.	Valores de absorbancia (600nm) de biomasa de <i>Pseudomonas</i> sp. 6 productora de biosurfactante.....	50
Tabla 12.	Absorbancia (600 nm) corregida y biomasa de <i>Pseudomonas</i> sp. 6 productora de surfactante en medio mínimo salino de Davis.....	51
Tabla 13.	Rendimiento de surfactante en función de la biomasa (Y p/x) de <i>Pseudomonas</i> sp. 6.....	52

RESUMEN

Los suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo (TPH), se puede recuperar con el proceso de biorremediación. En la refinería Talara de Graña y Montero Petrolera (GMP), región Piura se colectaron diez muestras de borras con el objetivo de determinar su potencial para la biorremediación. Los microorganismos hidrocarbonoclásticos se seleccionaron en caldo Bushnell-Haas con 1% de petróleo y se investigó la producción de surfactante en el medio mínimo salino Davis con glicerol como fuente de carbono. Las borras de hidrocarburos presentaron TPH, microorganismos totales e hidrocarbonoclásticos y severa toxicidad en la germinación de *Raphanus sativus* L. El 62,33% de las bacterias y el 37,66% de los hongos aislados de borras demostraron ser hidrocarbonoclásticos. El 62,33% de las bacterias y el 37,66% de los hongos hidrocarbonoclásticos demostraron ser productores de surfactantes. El rendimiento de surfactante en función de la biomasa de *Pseudomonas* sp. 6. seleccionada fue de 83%, demostrándose el potencial de *Pseudomonas* sp. 6 para la biorremediación.

Palabras claves: Borras de hidrocarburos, biorremediación, hidrocarbonoclásticos, surfactante.

ABSTRACT

Soils contaminated with total petroleum hydrocarbons (TPH) can be recovered with the bioremediation process. In the Talara de Graña and Montero Petrolera (GMP) refinery, Piura region, ten samples of borras were collected in order to determine their potential for bioremediation. The hydrocarbonoclast microorganisms were selected in Bushnell-Haas broth with 1% petroleum and the production of surfactant in the Davis minimum saline medium with glycerol was investigated as carbon source. The hydrocarbon wastes presented with TPH, total and hydrocarbonoclast microorganisms and severe toxicity in the germination of *Raphanus sativus* L. 62.33% of the bacteria and 37.66% of the fungi isolated from borras proved to be hydrocarbonoclast. 62.33% of bacteria and 37.66% of hydrocarbonoclast fungi proved to be surfactant producers. The yield of surfactant as a function of the biomass of *Pseudomonas* sp. 6. Selected was 83%, demonstrating the potential of *Pseudomonas* sp. 6 for bioremediation.

Keywords: Hydrocarbon strips, bioremediation, hydrocarbonoclastics, surfactant.

I. INTRODUCCIÓN

Las borras son residuos de los tanques y tuberías de la industria del petróleo, formados después de largos periodos, por sedimentación y agregación de sus constituyentes: agua, lodos (arena, rocas, lodos de perforación, materia orgánica) e hidrocarburos de petróleo (Gómez & Gómez, 2016). Las borras acumuladas reducen la capacidad de almacenamiento de los tanques y aumentan las pérdidas por fricción en las tuberías, con la consecuente disminución del caudal operativo del bombeo e incremento del gasto energético (Suárez, 2011).

Durante el mantenimiento regular de un tanque de almacenamiento y bombeo de crudo, se extraen, 450 a 600 mil barriles de borras (Suárez, 2011), con un contenido de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) de hasta 137 350 mg kg⁻¹ correspondientes a 5060 mg kg⁻¹ en la F2 (C10-C16), 55 260 mg kg⁻¹ en la F3 (C16-C34) y 77 030 mg kg⁻¹ en la F4 (C34-C50), valores que superan ampliamente los estándares de calidad ambiental (ECA) para suelos comerciales, industriales o extractivos (Ministerio del Ambiente, 2017).

Las borras son peligrosas por su toxicidad e inflamabilidad (Herrera, 2014), por lo que pueden ser almacenadas como máximo durante 1 año y después deben tener una disposición final (Carrasco & Oré, 2005). El tratamiento de las borras puede ser físico, térmico y biológico (Gómez & Gómez, 2016). Entre éstos, la incineración es el más antiguo, con rápida reducción del volumen, pero con generación de residuos y costos altos de capital, operación y mantenimiento (Suárez, 2011).

La biorremediación es un proceso biológico que acelera la degradación de los contaminantes orgánicos como los hidrocarburos de petróleo de las borras, mediante la actividad de los entes biológicos, entre los que destacan los microorganismos (Tahhan & Abu-Ateih, 2009; Ke et al., 2019); sin embargo, cuando éstos no son suficientes o no han sido seleccionados previamente en su capacidad metabólica, el proceso de biodegradación es lento y los contaminantes

no pierden su toxicidad o no son mineralizados (Torres & Zuluaga, 2001; Zhang, Li, Chen & Thring, 2011).

En el Perú las borras de hidrocarburos se disponen en rellenos de seguridad, generando altos costos económicos a las empresas y pasivos ambientales futuros para la sociedad o son vertidos inadecuadamente en el suelo, con degradación del ecosistema, contaminación del suelo, agua y aire por la descomposición, lixiviación y volatilización de los hidrocarburos totales de petróleo.

La población microbiana de los residuos peligrosos como las borras se adapta a las condiciones desfavorables y optimiza su actividad metabólica, transformándolos hasta reducir la toxicidad de los contaminantes (Zhang et al., 2011). Los microorganismos aislados y caracterizados en la presente investigación constituirán la base para implementar un método biológico que permita biodegradar el crudo de las borras, disminuyendo el impacto negativo en el ambiente y salud humana. En este contexto se planteó la siguiente investigación cuyo problema fue: ¿Cuáles son las características de los microorganismos aislados de las borras de hidrocarburos y cuál es su potencial para la biorremediación de suelo contaminado? La hipótesis fue: Los microorganismos aislados de las borras utilizan los hidrocarburos de petróleo como fuente de carbono y energía, producen surfactantes y tienen potencial para la biorremediación de suelo contaminado.

El objetivo general fue: Determinar las características de los microorganismos aislados de borras de hidrocarburos en la refinería Talara de Graña y Montero Petrolera (GMP), región Piura y su potencial para la biorremediación del suelo contaminado. Los objetivos específicos fueron: Caracterizar las borras de hidrocarburos en la refinería Talara de Graña y Montero Petrolera (GMP), región Piura, seleccionar microorganismos hidrocarbonoclásticos en las borras de hidrocarburos, seleccionar e identificar los microorganismos hidrocarbonoclásticos productores de surfactantes y determinar el rendimiento del surfactante en función de la biomasa del microorganismo con el mayor halo de emulsión de TPH.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

En sedimentos marinos impactados con TPH se seleccionaron consorcios para la biorremediación. Con once aislados bacterianos se obtuvo un cultivo mixto, se monitoreó la curva de crecimiento cada 3 días y la remoción de hidrocarburos por cromatografía de gases acoplada a masas, a los 0, 10 y 21 días. El cultivo mixto degradó el 68,6% de los alifáticos, en su mayoría n-alcanos de cadena larga (C12-C31) y alcanzó una población máxima de $3,13 \times 10^3$ UFC mL⁻¹. No se evidenció degradación de los hidrocarburos aromáticos. En el cultivo mixto se identificaron *Klebsiella*, *Chromobacterium*, *Flavimonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, demostrándose su potencial para constituir consorcios degradadores de hidrocarburos de petróleo (Narváez et. al., 2008)

En microcosmos con adición de nutrientes en forma de sales inorgánicas simples (SIS) y fenol (250 mgkg⁻¹ suelo), se evaluaron 11 cultivos de bacterias y tres controles: abiótico (CA), sustancia de referencia (diésel), microorganismos degradadores de diésel (SR) y microorganismo de referencia (*Acinetobacter*) sin fuente de carbono (CS). El mayor consumo de oxígeno (O₂) y producción de dióxido de carbono, (CO₂) así como las mayores tasas de consumo de O₂ correspondieron a *Stenotrophomonas* sp. y *Acinetobacter* sp. La mayor tasa de producción de CO₂ se alcanzó con *Acinetobacter* sp. La mayor tasa de consumo de O₂, producción de CO₂ y el coeficiente de respiración indicaron que *Acinetobacter* sp. mineralizó el fenol. (Ahumada & Gómez, 2009).

Los biosurfactantes son de gran importancia en la biorremediación. Se investigaron 12 aislados de bacterias de suelo contaminado con petróleo, seleccionándose cuatro fijadoras de nitrógeno con capacidad de crecimiento en queroseno como única fuente de carbono. La producción de biosurfactantes fue evaluada por determinación de la tensión superficial (TS) e índice de emulsificación (IE24). La variación de la producción fue atribuida a la especificidad metabólica de cada bacteria. El análisis de cromatografía en capa fina (TCL) demostró que el surfactante pertenecía al grupo polimérico de los ramnolípidos. Las bacterias

fijadoras de nitrógeno en suelos contaminados con petróleo producen biosurfactantes, por lo que tienen potencial para la biorremediación (Pérez, Anaya, Chang, Membrillo & Calva, 2010).

Microorganismos de suelo y aguas contaminadas se aislaron para investigar la remoción de TPH. Los consorcios aerobios se establecieron inoculando 1 mL del microcosmos en 99 mL de medio Bushnell – Haas (BH) con 0,5% de petróleo crudo. Se obtuvieron 22 consorcios, 14 aerobios y 8 anaerobios. En los aerobios se cuantificaron $1,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de microorganismos heterótrofos, con 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 sulfatoreductoras. Se alcanzó 27,91 a 62,31% de eficiencia de remoción del TPH en aerobiosis y 9,91 a 36,71% en anaerobiosis, concluyéndose que ambos consorcios pueden utilizarse para la biorremediación (Salazar, 2010).

Con el objetivo de obtener bacterias productoras de biosurfactantes, para su aplicación en técnicas de recuperación mejorada de hidrocarburos vía microbiana (MEOR), se colectaron muestras de hidrocarburos de tres pozos. Se obtuvieron cinco consorcios de bacterias capaces de crecer a 30, 40 y 60 °C utilizando glicerol, kerosene y melaza como fuentes de carbono, obteniéndose la máxima producción de biosurfactantes a 40 °C. El biosurfactante producido por *Pseudomonas aeruginosa* redujo la tensión superficial del medio de cultivo, de 60 a 40 m N/m, cuantificándose 26 mg de ramnolípidos L⁻¹, termoestables a 50-121 °C durante 1 hora. Se concluyó que las bacterias puedan ser aplicadas en técnicas de MEOR en yacimientos maduros (Mondragón, 2011).

La degradación de TPH en un suelo contaminado con borras se investigó, utilizando microorganismos autóctonos y compost. El inóculo microbiano correspondió a 19 colonias cultivadas en caldo peptonado 0,5% por 48 horas. El compost se obtuvo por fermentación aerobia de aserrín, hojas secas y verdes, estiércol de caprino y contenido ruminal de vaca, durante 6 meses. Se realizaron dos ensayos, considerando un control (suelo contaminado con borra), suelo contaminado + 250 g compost, suelo contaminado + compost + 500 mL microorganismos y suelo contaminado + 500 mL microorganismos. A los 24 días, con todos los tratamientos, disminuyó el TPH, alcanzando 70,16 a 85,41 % en el suelo contaminado + compost, frente a 6,08-10,12% en el control, demostrándose

efectividad del compost en la biorremediación del suelo contaminado con borras (Vivanco, 2013).

En tanques de almacenamiento de crudo de petróleo, gasolina, kerosene y diésel se investigó la diversidad de bacterias aerobias cultivables. Los microorganismos del agua sobrenadante en los diferentes reservorios se resuspendieron y aislaron en medio sales con 1% de crudo de petróleo. Después de la purificación, los microorganismos hidrocarbonoclasticos se identificaron a nivel fenotípico y molecular. Se obtuvieron bacterias en el crudo (35), kerosene (22), diésel (13) y gasolina (10), predominando especies de *Pseudomonas* y *Bacillus*, seguidas de *Staphylococcus*, *Enterobacter* sp., *Comamonas* sp. y *Paenibacillus* sp. El 36% de las bacterias degradaron fenol y el 12% catecol y ácido benzoico. Se concluyó que estas bacterias tienen potencial para la biorremediación de ambientes contaminados con TPH (Hamed et al., 2013).

La influencia de la aireación se investigó en el tratamiento biológico de borras de hidrocarburos. En el tanque de almacenamiento de crudo de una refinería se colectaron 5 kg de borras. Se obtuvieron siete mezclas con 3 kg de suelo agrícola + 0,75 kg de arena fina de playa no salinizada + 0,6 kg de borras y se añadió agua potable hasta obtener 20-30% de humedad en peso. A las mezclas con un TPH inicial de 13785 mg kg⁻¹ se les aplicó aireación durante 30 minutos por día, de 30 rpm en las mezclas 1, 2 y 3 y 60 rpm en las mezclas 4, 5 y 6, considerando como blanco la mezcla 7 sin aireación. El TPH disminuyó a menos de 5000 mg kg⁻¹ a los 42 días (60 rpm) y 62 días (30 rpm) con 95,43 y 93,57% de degradación, respectivamente. Se concluyó que la aireación beneficia la biodegradación de los hidrocarburos de petróleo en las borras (Herrera, 2014)

En un suelo contaminado con TPH se investigó la biodegradación con bacterias nativas a nivel de laboratorio. En el ensayo de biodegradación, las bacterias se cultivaron en medio mínimo sales minerales MMSM con pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, a 8, 25, 37, 55 °C, con 0.5; 1.5; 2 y 2,5% de petróleo crudo y 2, 4 y 6 gL⁻¹ de nitrógeno, N; fósforo, P y potasio, K. El crecimiento microbiano se determinó por turbidimetría en un espectrofotómetro de luz visible a 660 nm y el porcentaje de degradación del TPH por cromatografía líquida de alta eficiencia. Se obtuvieron seis aislados de bacterias, seleccionándose como óptimos para la biodegradación el pH 6; 2% de petróleo, 4 y 6 gL⁻¹ N, P, K, a 25 y 37 °C. Después de 40 días se alcanzó 93,5% en

la degradación del TPH, demostrándose el potencial de las bacterias para la biodegradación de hidrocarburos de petróleo (Valle, 2014).

2.2 Base teórica

La comunidad microbiana desempeña un papel importante en el flujo de energía, transformación de nutrientes y reciclaje de elementos en el ambiente. La teoría de la “Infalibilidad Microbiana” sostiene que todo compuesto orgánico biológicamente sintetizado puede ser descompuesto por los microorganismos (Alexander 1994). En este contexto, los contaminantes como el petróleo pueden ser degradados por los entes biológicos hasta dióxido de carbono y agua (Xu et al., 2018).

El petróleo, compuesto mayoritariamente por hidrocarburos es biodegradado en aerobiosis con mayor eficiencia (Pérez, Viguera, Gómez & Calva, 2015), pero también en anaerobiosis (Villareal, Balagurusamy, Rodríguez, Aguilar & Morlett, 2014). Los contaminantes, que pueden ser degradados o transformados por los seres vivos son susceptibles de ser eliminados mediante procesos de biorremediación. La capacidad metabólica de las poblaciones microbianas frente a los contaminantes de un suelo es el fundamento sobre el que se sustenta la tecnología de la biorremediación (Jain et al., 2011).

Los surfactantes son moléculas anfipáticas que se acumulan en las interfases gas/líquido (aire-agua), líquido/líquido (aceite-agua) o líquido/sólido (agua-superficie de sólidos), disminuyendo la tensión superficial e interfacial de las dos fases (Burgos et al., 2011). Como consecuencia, se forman microemulsiones de dos compuestos inmiscibles, donde los compuestos hidrofóbicos pueden solubilizarse con el agua o viceversa. La efectividad de todo surfactante es determinada por la reducción de la tensión superficial y la concentración de los surfactantes con la que se alcanza la mínima tensión superficial es la concentración micelar crítica (CMC), debajo de la cual las micelas se forman espontáneamente (Jiménez, Medina & Gracida, 2010).

Los biosurfactantes son moléculas cuya parte hidrofílica está constituida por aminoácidos, péptidos aniónicos o catiónicos y carbohidratos y la parte hidrofóbica por ácidos grasos saturados o insaturados (Jiménez et al., 2010). Los biosurfactantes producidos por humanos, plantas y microorganismos son

categorizados en cinco grupos: glicolípidos (ramnolípidos, soforolípidos, trehalolípidos), lipopéptidos (surfactinas, iturinas), fosfolípidos (fosfotidietanolamina), ácidos grasos (ácidos cirinomicólicos) y poliméricos (emulsano y liposano). Los biosurfactantes de bajo peso molecular (lipopéptidos) son buenos reductores de la tensión superficial e interfacial y los de alto peso molecular (emulsano) son mejores emulsificadores (Geetha, Banat & Joshi, 2018).

Los biosurfactantes son moléculas anfibólicas, que al igual que los surfactantes de naturaleza química presentan propiedades de detergencia, emulsificación, de-emulsificación, espumante y humectante, además de reducir la tensión superficial e interfacial entre sólidos y líquidos; sin embargo, su aplicación a gran escala está limitada, por el elevado costo (Deepika, Kalam, Sridhar, Podile & Bramhachari, 2016). Los biosurfactantes superan a los surfactantes químicos por su biodegradabilidad, estabilidad, baja concentración inoculadora crítica (CMC), actividad en un amplio rango de condiciones ambientales y baja toxicidad (Sharma, Singh & Verma, 2018).

Los biosurfactantes microbianos son producidos por bacterias, hongos y levaduras (Deepika et al., 2016); sin embargo, estos compuestos se han reportado mayoritariamente en *Bacillus* (Sharma, Singh & Verma, 2018), *Pseudomonas* (Deepika et al., 2016) *Rhodococcus* (Das & Chandran, 2011), *Acinetobacter* (Ismail, Van Hamme, Kilbane & Gu, 2017), *Ochrobacterium* (Bhattacharya, Guchhait, Biswas & Singh, 2019), *Luteibacter* (Zhang et al., 2011), *Chelatococcus* (Ke et al., 2019), *Pseudozyma* (Cavalcante, Simiqueli, de Andrade, Ghiselli & Pastore, 2015), *Citrobacter* (Ibrahim, 2016) y *Rhodococcus* (Das & Chandran, 2011).

2.2.1 Borrás

Las borras son residuos formados después de largos periodos en los tanques y tuberías en la industria del petróleo. Se forman por sedimentación y aglomeración de los compuestos hidrocarbonados del crudo, especialmente los de cadenas más largas, sólidos, sedimentos (rocas, arena, lodo de perforación), materia orgánica y agua (Suárez, 2011). Las borras son masas densas, viscosas con valores inferiores a 10 grados API, difíciles de bombear, que se depositan en el fondo de los tanques (Carrasco y Ore, 2000). Las borras están compuestas de

hidrocarburos parafínicos, asfaltenos, agua, compuestos de azufre, óxidos metálicos, gases disueltos y sólidos como arena y sedimentos; no obstante, la composición depende del tipo de crudo almacenado en el tanque. En las borras se distinguen tres fases: aceitosa, acuosa y sólida (Gómez y Gómez, 2016).

Los métodos de tratamiento de las borras son físicos, químicos, térmicos y biológicos. En los métodos físicos se consideran el asentamiento y sedimentación (la borra se deposita en una piscina para separar de forma natural los hidrocarburos y lodo), flotación, floculación y filtración (tratamiento del agua separada de los sólidos) y separación electrostática (aumento del tamaño de las gotas para facilitar la sedimentación por gravedad). Los métodos térmicos para el tratamiento de las borras, son la desorción térmica y la incineración. En el primero se remueven los orgánicos y agua de los sólidos y en el segundo método el material se quema a 800–1200° C (Gómez y Gómez, 2016).

Los métodos químicos incluyen el uso de disolventes de baja densidad que aumentan los grados API lo suficiente para reinyectar la mezcla en las tuberías. También se pueden utilizar rompedores de aglomeraciones, que reducen la viscosidad de la borra (Gómez y Gómez, 2016). La alta viscosidad de las borras es causada por la interacción de pequeñas aglomeraciones de asfaltenos en suspensión en la matriz general de hidrocarburos del crudo. Los diluyentes reducen la viscosidad de la borra con una separación más efectiva de los componentes y los floculantes incrementan el diámetro de éstos, mejorando la velocidad de separación. Como consecuencia, con la adición de químicos capaces de romper las aglomeraciones de asfaltenos o de agregar y separar los sedimentos se logra una fase líquida estable con sedimentos reducidos que pueda ser reinyectada en la línea de transporte (Suárez, 2011).

Los métodos biológicos están asociados al tratamiento final del agua separada de las borras. La biodefenolización remueve los fenoles mediante microorganismos aerobios y anaerobios. En la biodesulfurización las bacterias oxidan los compuestos reducidos del azufre. En los filtros biológicos el agua se pone en contacto con la biomasa microbiana adherida a un soporte que constituye un lecho de oxidación biológica. En la técnica de land farming “*in situ*” o “*ex situ*” se favorece la oxidación biológica de los hidrocarburos del suelo mediante la

estimulación de los microorganismos con la adición de fertilizantes (Gómez y Gómez, 2016).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

Borras de la Refinería Talara de Graña y Montero Petrolera (GMP) y semillas de *Raphanus sativus* L. “rabanito”

3.1.2 Población y muestra

La población correspondió a los microorganismos de las borras de hidrocarburos en la Refinería Talara de Graña y Montero Petrolera (GMP), región Piura y se investigaron los microorganismos procedentes de diez muestras de borras no probabilísticas y por conveniencia (Hernández, Fernández y Baptista, 2014), colectadas durante noviembre de 2018.

3.2 Métodos

3.2.1 Variables cuantitativas

Concentración de hidrocarburos totales de petróleo (TPH), Número más probable de microorganismos totales, Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos, Hidrocarbonoclasticidad.

3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

La investigación fue descriptiva y la hipótesis se contrastó mediante el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt (Hernández et al., 2014)

3.2.3 Lugar de muestreo y obtención de muestras

En la Refinería Talara de Graña y Montero Petrolera (GMP), región Piura se colectaron diez muestras de borras (Figuras 1, 2). La provincia de Talara es una de las ocho que conforman la región Piura y está ubicada entre los paralelos 4°34'37" latitud sur y 81°16'19" longitud oeste.



Figura 1. Ubicación de Refinería Talara de Graña y Montero Petrolera (GMP).

<https://www.google.com.pe/maps/place/Planta+Refineria+Talara/@4.5772362,81.2801303,220m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x9036443b8cb85037:0xa1e76338d124189f!8m2!3d-4.5775773!4d-81.2798337>



Figura 2. Muestras de borras de hidrocarburos.

Talara limita por el norte con el departamento de Tumbes, por el este con la provincia de Sullana, por el sur con la provincia de Paita y por el este con el Océano Pacífico (Wikipedia, 2017).

En los tanques de almacenamiento de las borras de hidrocarburos en la Refinería Talara de Graña y Montero Petrolera (GMP) se colectaron diez muestras de aproximadamente 1 kg, se depositaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas e inmediatamente se transportaron en una caja térmica, $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$, hacia el laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, en Lambayeque.

3.2.4 Determinación de las características químicas, microbiológicas y toxicidad de las borras de hidrocarburos

Las muestras de borras de hidrocarburos (Figura 3) se homogenizaron mediante el método del cuarteo y amontonamiento (Ayasta y Bernable, 2012). La masa de borra del extremo inferior derecho se mezcló cinco veces con el superior izquierdo, el inferior izquierdo con el superior derecho, el superior con el inferior y el derecho con el izquierdo. En cada cambio de posición del suelo se formó un “montón” y al finalizar se tomaron las submuestras: cuatro de 10g y una de 100g.

El análisis químico del suelo contaminado se realizó en dos muestras compuestas de 1kg (diez submuestras de 100g), en el laboratorio de ensayo acreditado por registro N° LE-096: Analytical Laboratory E.I.R.L., en Lima, Perú, determinándose las concentraciones de hidrocarburos totales (TPH), mercurio, arsénico, bario, cadmio, plomo, cromo total y hexavalente.

El análisis microbiológico de submuestras de 10g consistió en determinar el número más probable (NMPg⁻¹) de microorganismos totales e hidrocarbonoclasticos. Las submuestras se depositaron en matraces con 90mL de solución salina, NaCl 0,85% (p/v), obteniéndose suspensiones del suelo, con las que se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-7} (Contreras & Carreño, 2018). Para determinar el NMP de microorganismos totales, 1mL de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} se inocularon por triplicado en tubos de 150 x 20 mm conteniendo 5 mL de caldo nutritivo (Figura 4).



Figura 3. Borra de hidrocarburos homogenizada.

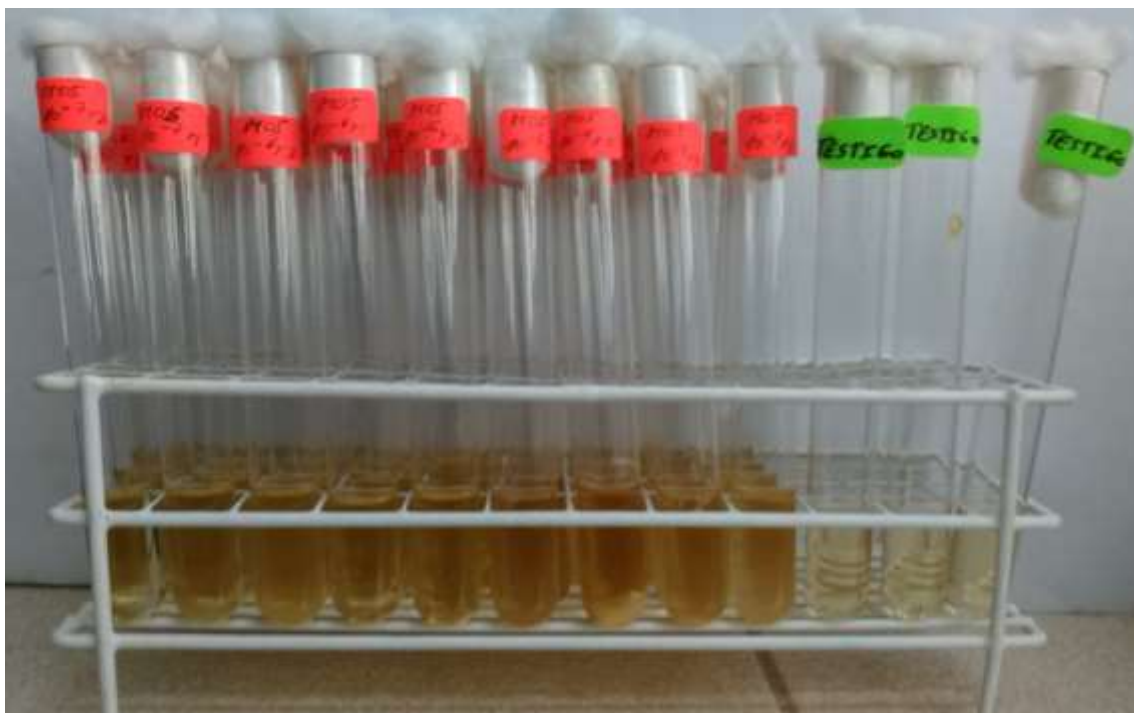


Figura 4. Número más probable de microorganismos totales en borras de hidrocarburos.

Para el NMP de hidrocarbonoclasticos, 1 mL de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se inocularon por triplicado en tubos con 5 mL de caldo Bushnell – Haas (Anexo A) e inmediatamente después en cada tubo se vertieron 0,05 mL (dos gotas) de petróleo crudo como fuente de carbono (Figura 5). Los tubos se incubaron a 30 °C por 10 días y la turbidez del medio de cultivo se consideró positivo a la presencia de microorganismos totales e hidrocarbonoclasticos, realizándose el cálculo correspondiente.

La toxicidad de los contaminantes del suelo experimental se determinó por triplicado en submuestras de 10 g (Contreras & Carreño, 2018), utilizando semillas de rabanito, a las que previamente se les determinó el porcentaje de germinación. En cuatro placas de Petri con papel filtro esterilizado y humedecido con agua destilada se depositaron 25 semillas por placa, se taparon y se mantuvieron a temperatura ambiental (28 °C), humedeciéndolas interdiariamente hasta obtener el máximo de germinación, después de 120 horas (Figura 6).

Para el ensayo de toxicidad (Figura 7), en cuatro placas de Petri se colocaron dos capas de papel filtro sobre la base de la placa, se depositaron submuestras de 10 g de borra, se humedecieron con 5 mL de agua destilada y en cada placa con una pinza se depositaron 25 semillas de rabanito. Todas las placas de Petri se cubrieron con papel metálico y se mantuvieron a 30 °C. A las 120 horas se contaron las semillas germinadas y se midió la longitud de las radículas emergidas (Figura 8), calculando el porcentaje relativo de germinación (PGR), crecimiento relativo de la radícula (CRR) e índice de germinación (IG):

$$PGR = \frac{\text{Número de semillas germinadas en borras}}{\text{Número de semillas germinadas en el testigo}} \times 100$$

$$CRR = \frac{\text{Longitud promedio de radículas en borras}}{\text{Longitud promedio de radículas en el testigo}} \times 100$$

$$IG = \frac{PGR \times CRR}{100}$$



Figura 5. Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclásticos en borras de hidrocarburos.

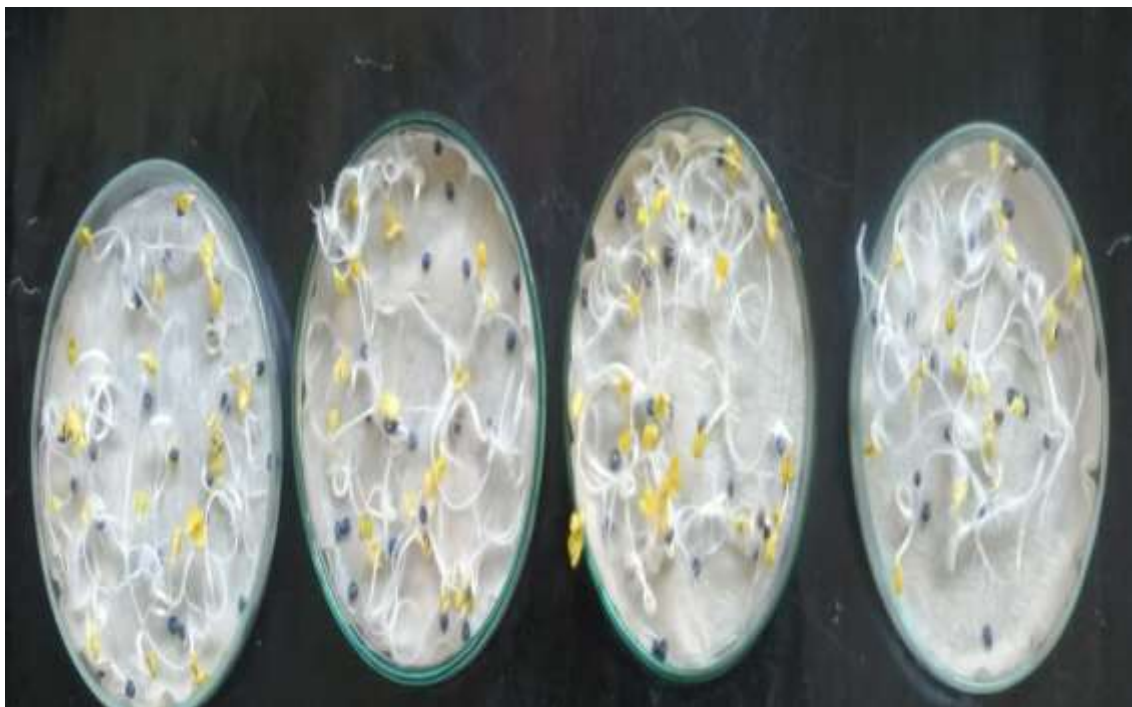


Figura 6. Prueba de germinación de semillas de *Raphanus sativus* L.



Figura 7. Prueba de toxicidad de contaminantes de borras de hidrocarburos.



Figura 8. Radículas de *Raphanus sativus* L. en la prueba de toxicidad.

La fitotoxicidad se determinó con el criterio de interpretación (Rodríguez, 2012): $IG > 80\%$ indica que no hay sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración; $80\% > IG > 50\%$ se interpreta como presencia moderada de estas sustancias y un $IG < 50\%$ indica fuerte presencia de sustancias fitotóxicas, criterios correspondientes a niveles de fitotoxicidad bajo, moderado y severo (Contreras & Carreño, 2018).

3.2.5 Selección de microorganismos hidrocarbonoclásticos en las borras de hidrocarburos

Los microorganismos de las muestras de borras se enriquecieron depositando 10 g de cada muestra en frascos de 250 mL de capacidad, conteniendo 90 mL de caldo Bushnell - Haas y se incubaron a 30 °C, durante 3 días. Para el aislamiento se tomaron alícuotas y se sembraron por agotamiento y estría en agar nutritivo (Anexo B) para bacterias (Sharma, Singh & Verma, 2018) y agar Papa Dextrosa (PDA) para hongos (Contreras y Carreño, 2018).

Las colonias de los microorganismos desarrollados se agruparon según sus características macroscópicas, se seleccionó una representante de cada morfotipo, las bacterias se cultivaron en agar Tripticosa Soya (TSA) y los hongos en agar Papa Dextrosa (PDA), constituyendo los cultivos puros de microorganismos que se guardaron en refrigeración a 8 °C.

Los microorganismos hidrocarbonoclásticos o degradadores de hidrocarburos de petróleo fueron aquellos que utilizaron el contaminante como fuente de carbono (Figura 9) y energía en un periodo de 10 días (Contreras & Carreño, 2018). Los microorganismos fueron sembrados por triplicado en 5 mL de caldo Bushnell - Haas con 1% (0,05mL) de petróleo crudo, incluyendo tres tubos con caldo no inoculado (testigo), se incubaron a 30 °C, con agitación manual diaria por 10 minutos y se registraron los días requeridos para su crecimiento denotado por la turbidez.

3.2.6 Selección e identificación de los microorganismos hidrocarbonoclásticos productores de surfactantes

La prueba de dispersión de gota, se utilizó para detectar el biosurfactante producido por los microorganismos, observando un halo de emulsión formado sobre una capa de hidrocarburos de petróleo.



Figura 9. Caldo Bushnell-Haas cultivado con microorganismos aislados de borras de hidrocarburos.

La cantidad de biosurfactante producido es directamente proporcional al diámetro del halo de emulsión observado (Sulbarán, Bahsas, Velásquez & Otoniel, 2005).

El inóculo estuvo constituido por los microorganismos sembrados por triplicado en 1 mL de medio mínimo salino Davis con 1 % de glicerol (Figura 10, anexo C) e incubados a 30 °C, durante 24 horas, con agitación manual (5 minutos) cada 4 horas. Después, los microorganismos se cultivaron por triplicado en 5 mL del mismo medio, a 30 °C, durante 72 horas (Figura 11), con agitación manual (5 minutos) cada 12 horas. Los caldos cultivados se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes se utilizaron para la prueba de dispersión de gota.

Placas de Petri de 90 mm de diámetro se colocaron sobre papel milimetrado (Figura 12) y en cada una de ellas se depositaron 10 mL de agua destilada. Después se vertieron 0,5 mL de petróleo crudo liviano, cuidadosamente y en toda la superficie (Figura 13), tratando que se forme una capa homogénea. En simultáneo se acondicionaron jeringas de tuberculina de 1 mL, a las que se les adaptaron “tips” en reemplazo de la aguja correspondiente. Con éstos se tomaron tres gotas (10 uL por gota) del sobrenadante del cultivo bacteriano y a una altura de 20 cm se depositaron en un tercio de la superficie del contenido de la placa de Petri (Figuras 14, 15). Este proceso se realizó tres veces, constituyendo las repeticiones para cada cultivo microbiano y después de 5 minutos se midió el diámetro del halo de dispersión formado.

Los diez cultivos microbianos con los mayores diámetros en el halo de emulsión se seleccionaron y se identificó el género con base a las características fenotípicas (Cerqueira et al., 2011; Hamed et al., 2013), utilizando el Manual de Bergey (Holt et al., 1994) para bacterias y las claves de Barnett & Hunter (1998) para hongos.

3.2.7 Valoración de la producción de surfactantes

La valoración de la producción de surfactantes se realizó determinando el rendimiento Y (p/x) o coeficiente de rendimiento del producto en función de la biomasa (Dorán, 1998).



Figura 10. Inóculo microbiano en medio mínimo salino Davis con glicerol.



Figura 11. Microorganismos en medio mínimo salino Davis con glicerol.

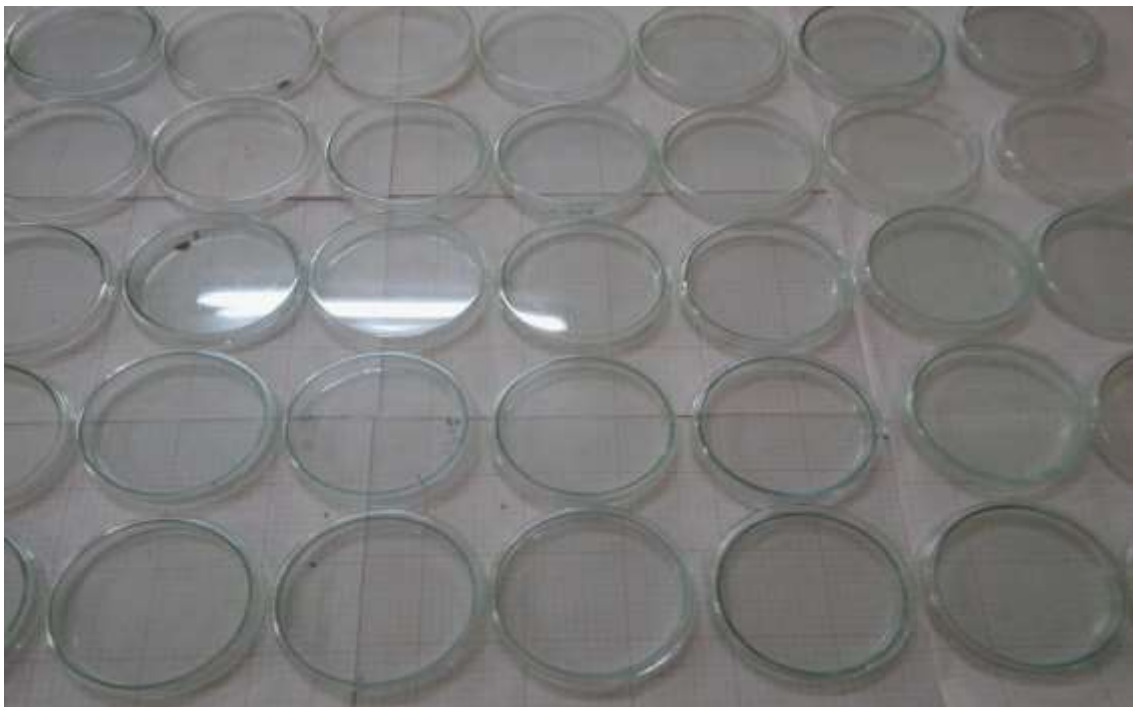


Figura 12. Placas de Petri con agua destilada para la prueba de dispersión de gota.



Figura 13. Adición de petróleo crudo liviano sobre la superficie de agua destilada.

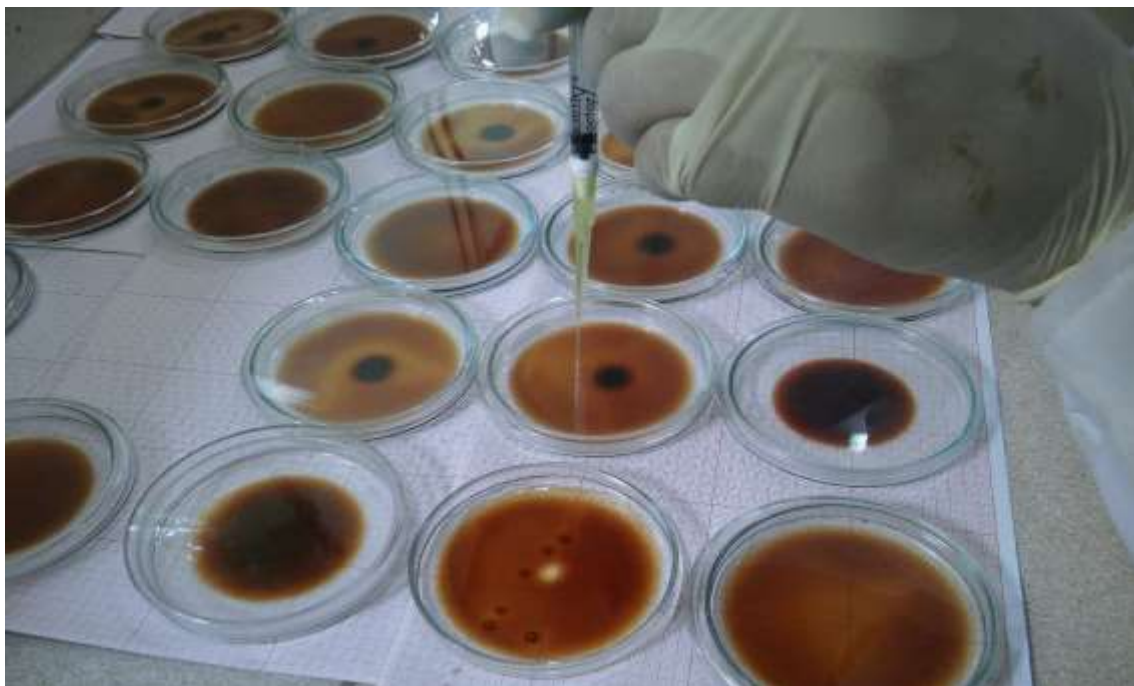


Figura 14. Adición de sobrenadante del medio mínimo salino Davis sobre el petróleo crudo liviano.

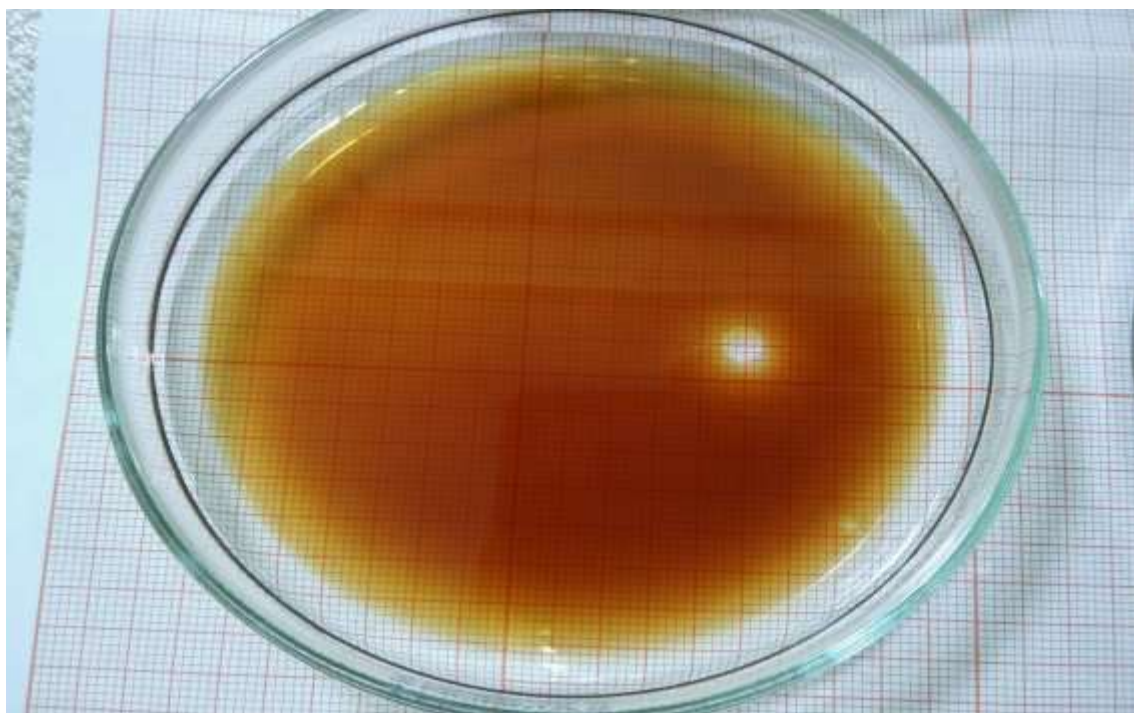


Figura 15. Halo de emulsión formado sobre la capa de hidrocarburos de petróleo.

Las bacterias productoras de surfactantes fueron cultivadas en medio mínimo salino de Davis y después de 72 horas se cuantificó la biomasa y el surfactante y se calculó el coeficiente de rendimiento $Y_{p/x}$.

a. Proceso productivo

Se acondicionaron 33 biorreactores tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente (Guzmán et al., 2017), constituidos por frascos de 0,5 L de capacidad y ajustados a la geometría y proporciones de un biorreactor estándar (Figura 16). El extremo superior de cada biorreactor estuvo cubierto por una tapa de goma que presentó dos orificios. A través del primer orificio ingresó una cánula de plástico llevando aire insuflado (1vvm) por una compresora de aire Elite 803 de 4 watts y esterilizado por un sistema de burbujeo en cloruro de sodio al 30%. Por el segundo orificio ingresó una cánula taponada en su extremo superior con algodón para permitir la salida de gases. Los frascos de vidrio se esterilizaron en horno (180°C por 2 horas), el material de plástico y goma se sumergió en hipoclorito de sodio al 5% durante 30 horas y posteriormente fueron irradiados con luz ultravioleta por 0,5 horas.

Los diez microorganismos desarrollados en 2mL de medio mínimo salino Davis en 1% de glicerol e incubados a 30°C durante 24 horas (bacterias) y 96 horas (hongos), con agitación manual (5 minutos) cada 4 horas, se cultivaron en 5mL del mismo medio, bajo similares condiciones que para la obtención del inóculo microbiano. A continuación, los microorganismos, se cultivaron por triplicado en 300 mL de medio mínimo salino de Davis con 1 % v/v de glicerol contenidos en el biorreactor, incubándose durante 4 días (bacterias) y 7 días (hongos) a 30 °C (Figura 17), con agitación constante manual (5') cada 12 horas (Sulbarán et al., 2005). Después de la incubación los caldos cultivados se centrifugaron para la prueba de dispersión de gota, realizándose la lectura del diámetro del halo de dispersión a los 0, 5, 10, 15 minutos (Figuras 18 a 20). El microorganismo con los mayores valores en los halos de emulsión se seleccionó para determinar el rendimiento.

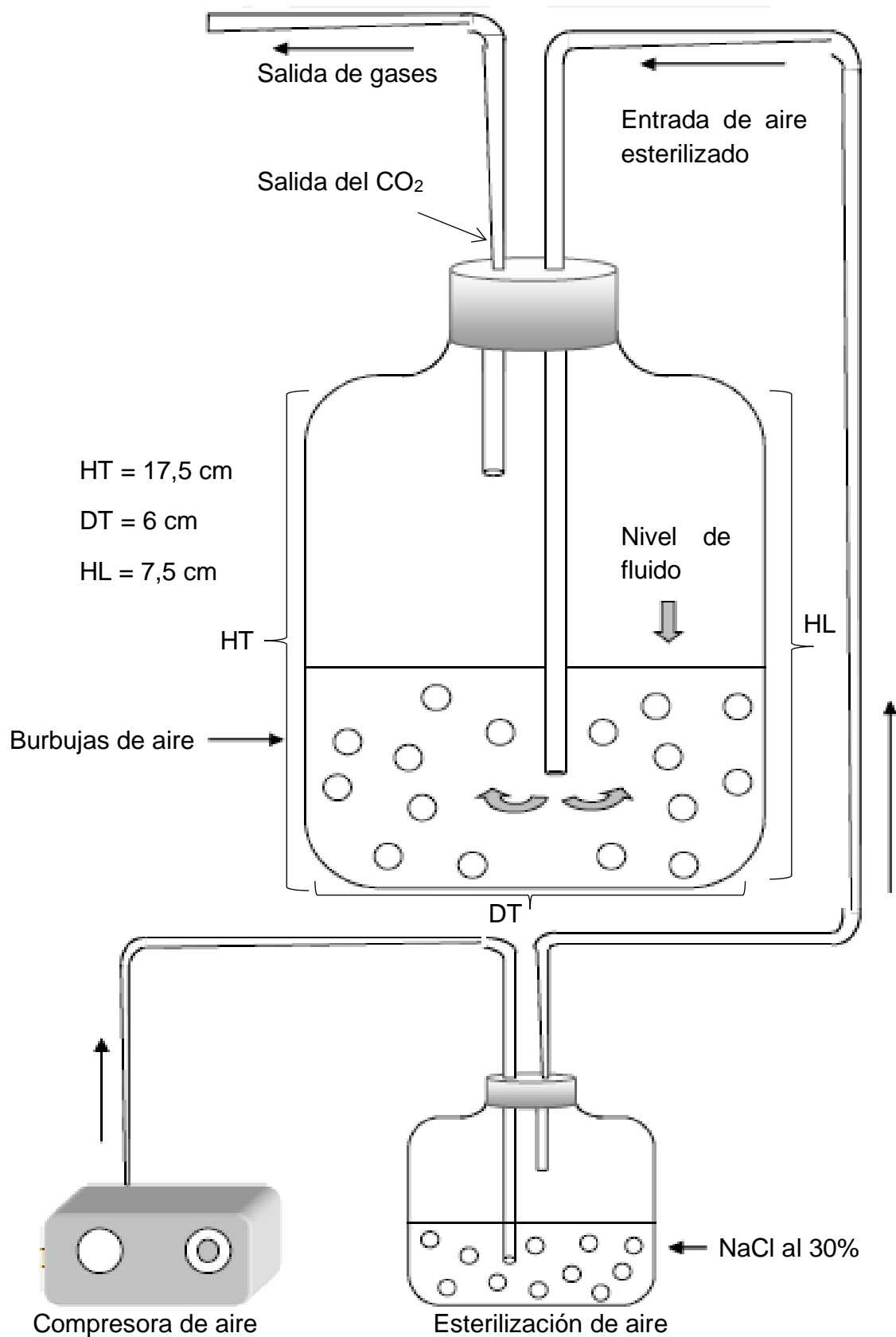


Figura 16. Diseño y modo de operación de biorreactor tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente (Guzmán et al., 2017).



Figura 17. Biorreactores de tipo tanque con sistema discontinuo y flujo de aire descendente.



Figura 18. Medio mínimo salino Davis cultivado con microorganismos aislados de borras de hidrocarburos de petróleo.

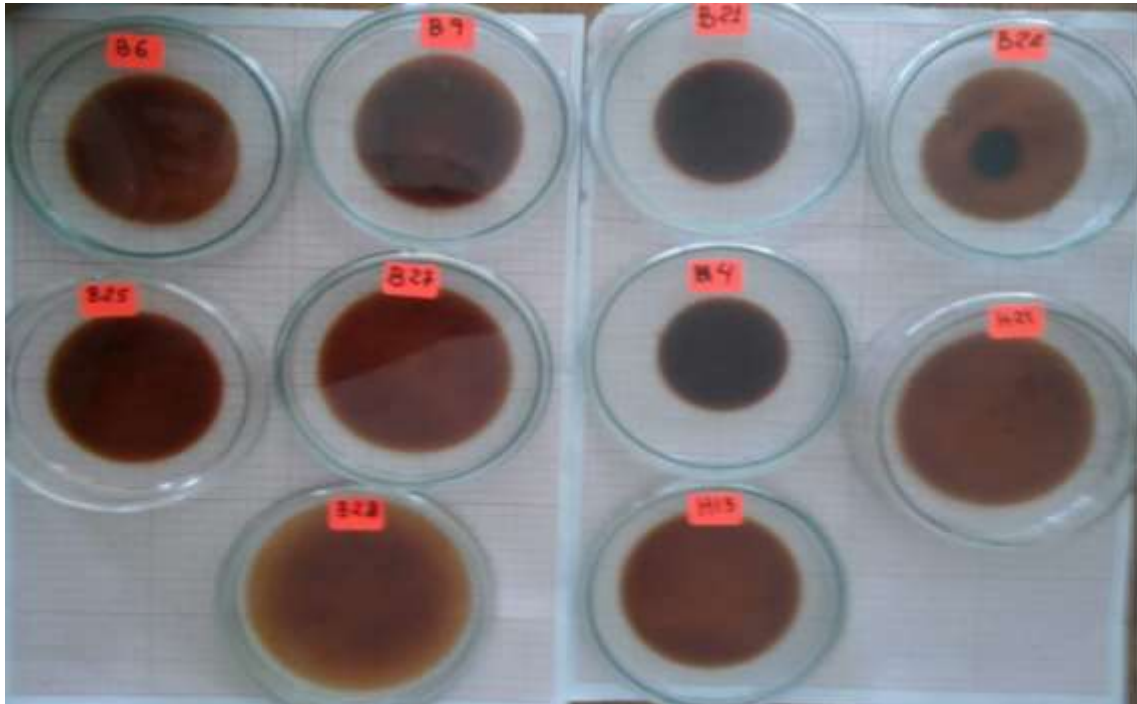


Figura 19. Placas de Petri con petróleo crudo liviano para la prueba de dispersión de gota.



Figura 20. Prueba de dispersión de gota por medio mínimo salino Davis cultivado por microorganismos aislados de borras.

b. Obtención de biomasa

Para cuantificar la biomasa por turbidimetría (Guzmán et al., 2017) a 600 nm (DO600), inicialmente se obtuvo la curva patrón entre densidad óptica y biomasa seca. El microorganismo previamente seleccionado y desarrollado en agar mínimo salino, a 30 °C, por 24 horas, se cultivó en 100mL de medio mínimo salino de Davis, hasta alcanzar 10^7 cel mL^{-1} (tubo 1 del nefelómetro de Mac Farland).

En el medio mínimo cultivado se tomaron 4 mL, tres para determinar por triplicado la absorbancia a 600 nm (tubo 1) y uno para realizar diluciones decimales hasta 10^{-3} (tubos 2, 3, 4), a los que también se les determinó la absorbancia. Los 96 mL restantes de medio mínimo salino fueron centrifugados a 3500 rpm, durante 30 minutos.

El sedimento o biomasa se lavó en solución salina esterilizada, se centrifugó y deshidrató a 42 °C, hasta alcanzar peso constante. La biomasa deshidratada fue pesada y el valor obtenido expresado en gramos por litro (g L^{-1}), correspondiendo a la absorbancia del tubo 1. Asimismo, el valor de la biomasa se dividió entre 10, 100 y 1000, correspondientes a la absorbancia de los tubos 2, 3 y 4 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Con los valores de biomasa y absorbancia, se obtuvo la ecuación de regresión, con la que se calculó la concentración de la biomasa del microorganismo investigado cultivado en medio mínimo salino de Davis por un tiempo determinado (Guzmán et al., 2017).

c. Recuperación y cuantificación del biosurfactante

Para la recuperación del surfactante producido (Pérez et al., 2010; Burgos et al., 2011), el cultivo microbiano de 2 días se centrifugó a 3500 rpm, durante 20 minutos. El extracto crudo libre de células se acidificó hasta alcanzar un pH 2, mediante la adición de HCl 1N (Sulbarán et al., 2005), se dejó en reposo en refrigeración por 48 horas y después se centrifugó nuevamente a 5000 rpm, por 20 minutos. El biosurfactante se recuperó en una pera de decantación, en la cual se vertieron inicialmente 100 mL del sobrenadante, añadiéndole inmediatamente 150 mL de acetato de etilo (Figura 21). Se realizaron tres extracciones sucesivas, con intervalos de 1 hora.

En cada extracción se recuperó el sobrenadante o acetato de etilo conteniendo el biosurfactante que fue depositado en un vaso de precipitación, para ser evaporado a 40 °C, hasta alcanzar peso constante y finalmente ser pesado.

El $Y (p/x)$ o coeficiente de rendimiento del producto en relación con la biomasa o cantidad del producto obtenido por cantidad de biomasa formada (gg^{-1}), se calculó dividiendo los gramos de biosurfactante entre los gramos de biomasa (Dorán, 1998).

3.2.8 Análisis de los datos

Los valores obtenidos en la selección de microorganismos hidrocarbonoclásticos productores de surfactantes y en la valoración de los surfactantes producidos fueron ordenados en tablas y figuras que permitieron analizar las características de los microorganismos aislados de las borras de hidrocarburos de petróleo, utilizando los programas Microsoft Office Word y Excel versión 2007.



Figura 21. Recuperación de biosurfactante en pera de decantación.

IV. RESULTADOS

4.1 Características químicas, microbiológicas y toxicidad de las borras de hidrocarburos

Las borras de hidrocarburos de la refinería Talara de Graña y Montero Petrolera (GMP) presentaron hidrocarburos totales de petróleo, metales, microorganismos totales e hidrocarbonoclasticos y un nivel severo de fitotoxicidad en semillas de rabanito (Tablas 1, 2, 3).

4.2 Microorganismos hidrocarbonoclasticos aislados y seleccionados en borras de hidrocarburos

En las borras de hidrocarburos se obtuvieron 110 aislamientos de microorganismos, correspondientes a 56,36% (62) de bacterias y 43,63% (48) de hongos (Tabla 4, figuras 22 a 25). El 70% (77) de los microorganismos demostraron ser hidrocarbonoclasticos, al desarrollar con el petróleo como fuente de carbono y energía (Figura 26), diferenciándose el 62,33% (48) de bacterias y 37,66% (29) de hongos.

4.3 Géneros de microorganismos productores de surfactantes identificados en borras de hidrocarburos

Entre los microorganismos hidrocarbonoclasticos el 62,3% (48) de las bacterias y 37,66% (29) de los hongos demostraron ser productores de surfactantes (Figuras 27, 28). El diámetro de los halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo producidos por las bacterias hidrocarbonoclasticos osciló entre 2,09 a 15,33 mm a los 0 minutos y 1,33 a 16,67 mm a los 5 minutos (Tabla 5). El diámetro de los halos producidos por los hongos hidrocarbonoclasticos osciló entre 1,23 a 12,67 mm a los 0 minutos y 0,9 a 11 mm a los 5 minutos (Tabla 6).

Tabla 1

Características químicas de borras de hidrocarburos de petróleo de Refinería Graña y Montero Petrolera (GMP) en Talara, Piura, 2019

Características (mg kg ⁻¹ MS)	Muestras		Norma de referencia	Técnica
	M ₁	M ₂		
HT* C5 - C10	<10	<15	EPA 8015 CTPH'S 2007	Cromat CG FID
HT* C10 - C28	<20	<18,43	EPA 8015 CTPH'S 2007	Cromat CG FID
HT* C28 - C40	<35	<23,4	EPA 8015 CTPH'S 2007	Cromat CG FID
Mercurio	5,36	7,28	EPA Method 7471 B Rev. 2. 2007	Mercury in solid or Semisolid Waste (Manual Cold Vapor Technique)
Arsénico	<40	<50	EPA Method 3050 B-Rev. 2/ 7061A -Rev. 2. 1996/1992	Method Acid Digestion of Sediments, sludges, and Solis/Arsenic (atomic absorption, gaseous hydride)
Bario	<80	<70	EPA Method 3050 Rev. 2/ 7000B-Rev. 2. 1996/2007	Method Acid Digestion of Sediments, sludges, and Solis/Flame (Espectrofotometría absorción atómica)
Cadmio	<10	<20	EPA Method 3050 B-Rev. 2/ 7000B-Rev. 2. 1996/2007	Method Acid Digestion of Sediments, sludges, and Solis/Flame (Espectrofotometría absorción atómica)
Plomo	<20	<20	EPA Method 3050 B-Rev. 2/ 700 B-Re. 2. 1996/2007	Method Acid Digestion of Sediments, sludges, and Solis/Flame (Espectrofotometría absorción atómica)
Cromo total	<20	<20	EPA Method 3050 B- Rev.2/ 7000B- Rev.2. 1996/2007	Method Acid Digestion of Sediments, sludges, and Solis/Flame (Espectrofotometría absorción atómica)
Cromo hexavalente	<4,52	<5,13	EPA Method 3060 Rev. 11996/ EPA, Method 7196 Rev. 1 1992	Alkaline Digestion for Hexavalent Chromium/ Chromium Hexavalent (Colorimetric)

*HT: Hidrocarburos totales de petróleo

Tabla 2

Número más probable de microorganismos totales e hidrocarbonoclasticos en borras de hidrocarburos de petróleo, procedentes de Refinería Graña y Montero Petrolera (GMP) en Talara, Piura, 2019

Borras	NMP			
	*Totales		**Hidrocarbonoclasticos	
	Nº	Lectura NMPg ⁻¹	Lectura NMPg ⁻¹	
1	3 3 1	4,6 x 10 ⁵	3 3 1	4,6 x 10 ³
2	1 1 0	7,3 x 10 ³	3 2 2	2,1 x 10 ³
3	3 3 1	4,6 x 10 ⁵	3 2 2	2,1 x 10 ³
4	3 1 1	7,5 x 10 ⁴	2 2 0	2,1 x 10 ²
5	3 2 1	1,5 x 10 ⁵	3 1 0	4,3 x 10 ²
6	3 2 1	1,5 x 10 ⁵	3 3 2	1,1 x 10 ⁵
7	3 1 1	7,5 x 10 ⁴	3 2 2	2,1 x 10 ⁴
8	2 2 0	2,1 x 10 ⁴	3 2 0	9,3 x 10 ³
9	3 1 1	7,5 x 10 ⁴	3 0 0	2,3 x 10 ³
10	3 0 0	2,3 x 10 ⁴	3 3 3	>1,1 x 10 ⁵

*Diluciones 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ ** 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶

Tabla 3

Nivel de toxicidad de borras de hidrocarburos de petróleo procedentes de Refinería Graña y Montero Petrolera (GMP) en Talara, Piura, 2019

Borras Nº	Promedio elongación radicular (mm)	Porcentaje relativo geminación (PGR)	Crecimiento relativo de radícula (CRR)	Índice de germinación (%IG)	Nivel de fitotoxicidad
1	68	31,81	90,60	28,81	Severo
2	0	0	0	0	Severo
3	47	6,81	62,66	4,26	Severo
4	61	40,90	81,33	33,26	Severo
5	49	22,15	65,88	14,52	Severo
6	54	21,02	72,00	15,13	Severo
7	0	0	0	0	Severo
8	0	0	0	0	Severo
9	0	0	0	0	Severo
10	0	0	0	0	Severo

Tabla 4

Microorganismos aislados de borras de hidrocarburos de petróleo procedentes de Refinería Graña y Montero Petrolera (GMP) en Talara, Piura, 2019

Borras Nº	Cultivos de microorganismos	
	Nº de bacterias	Nº de hongos
1	2	2
2	8	2
3	5	2
4	7	4
5	5	5
6	6	3
7	7	5
8	8	2
9	7	2
10	7	9
Total	62	48



Figura 22. Bacterias de borras de hidrocarburos aisladas en agar nutritivo



Figura 23. Hongos de borras de hidrocarburos aislados en agar papa dextrosa.



Figura 24. Cultivos puros de bacterias en agar tripticasa soya.



Figura 25. Cultivos puros de hongos en agar papa dextrosa.



Figura 26. Turbidez en caldo Bushnell – Haas por el crecimiento de microorganismos hidrocarbonoclásticos.



Figura 27. Halos de emulsión formado sobre la capa de hidrocarburos de petróleo por aislamiento bacteriano 6.

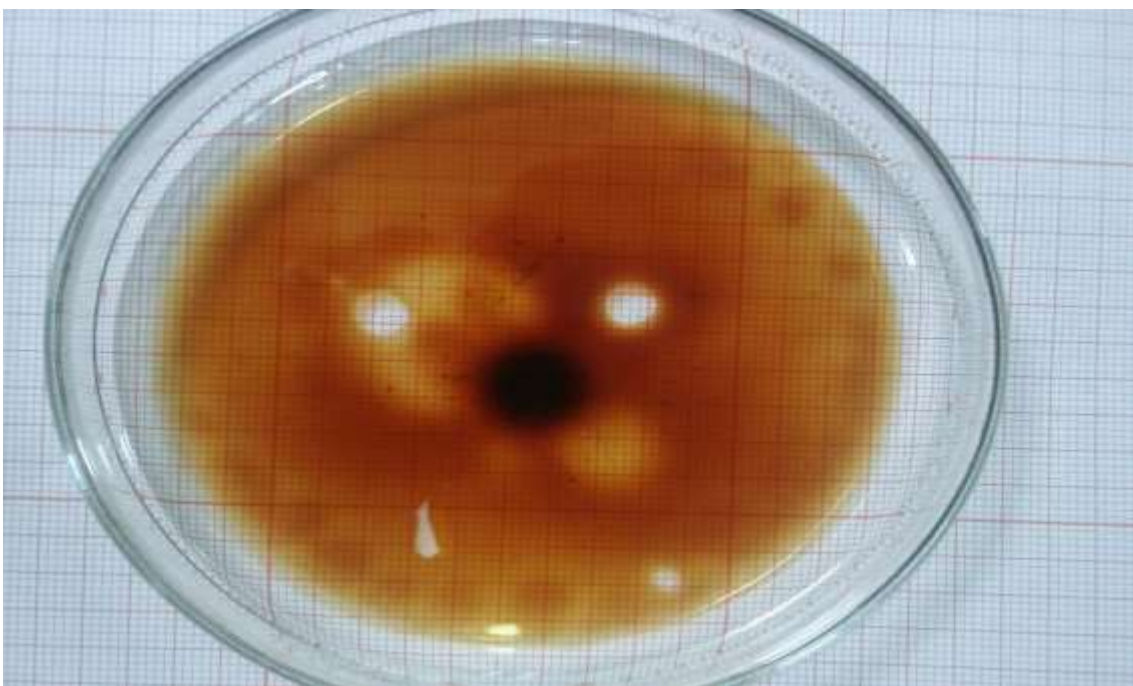


Figura 28. Halos de emulsión formado sobre la capa de hidrocarburos de petróleo por aislamiento de hongo 23.

Tabla 5

Diámetro de los halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo producidos por bacterias hidrocarbonoclasticas

Tratamientos	Halos* de emulsión (mm)	
	0 minutos	5 minutos'
B1	3,67	2,67
B2	4,67	3,33
B5	5,67	4,67
B6	12,33	9,00
B7	7,00	5,00
B9	10,00	9,00
B10	3,67	2,00
B11	6,00	3,67
B13	6,33	4,67
B14	6,00	3,67
B15	2,67	2,33
B16	4,00	4,00
B17	8,00	2,67
B19	6,67	8,67
B20	13,00	2,00
B21	11,00	10,33
B22	9,33	9,33
B23	3,33	1,33
B24	8,33	7,67
B25	15,33	13,33
B26	6,67	5,67
B27	10,00	11,67
B28	18,33	16,67
B29	3,33	1,33
B30	7,00	2,33
B31	3,33	3,33
B32	6,00	1,67
B33	4,00	4,33
B34	5,00	4,67
B36	7,00	4,00
B39	7,67	4,00
B40	4,00	3,21
B41	3,22	2,11
B42	3,13	2,45
B43	4,01	3,02
B44	3,05	2,01
B45	2,09	1,50

B46	1,50	1,33
B47	3,22	2,09
B48	3,44	2,01
B49	2,56	2,09
B50	3,90	2,34
B51	3,65	1,40
B52	2,90	2,09
B53	3,45	2,56
B54	3,67	2,39
B55	4,90	2,35
B56	1,09	0,90

*Promedio de tres repeticiones

Tabla 6

Diámetro de los halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo producidos por hongos hidrocarbonoclasticos

Tratamientos	Halos* de emulsión (mm)	
	0 minutos	5 minutos
H1	3,67	2,67
H2	6,33	5,33
H3	3,00	2,33
H4	10,00	9,00
H5	8,00	5,67
H6	5,33	5,33
H7	7,67	6,00
H8	6,33	2,33
H9	5,00	2,00
H10	2,67	1,67
H11	10,67	8,00
H12	5,67	4,33
H13	12,67	11,00
H14	2,67	1,33
H15	3,67	3,67
H16	3,00	2,00
H17	3,67	3,67
H19	2,67	2,33
H20	9,33	7,00
H21	10,67	10,00
H22	2,00	1,00
H23	5,00	4,33
H24	4,00	1,00
H25	1,90	1,09
H26	1,50	0,90
H27	1,23	1,00
H28	2,00	2,00
H29	1,45	1,34
H30	1,67	1,69

*Promedio de tres repeticiones

Los microorganismos seleccionados por presentar los mayores diámetros en los halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo se identificaron en los géneros de bacterias: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* (Figura 29 a 31, tablas 7,8) y hongos: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cunninghamella* (Figuras 32 a 35, tabla 9).

4.4 Rendimiento de surfactante en función de la biomasa del microorganismo con el mayor halo de emulsión de TPH

En el proceso de producción de surfactantes en biorreactores tipo tanque con sistema discontinuo, se alcanzaron halos de emulsión de 6,33 a 16,33 mm (0 minutos); 5,33 a 16,33 (5 minutos); 4,0 a 15,0 (10 minutos) y 1,33 a 12,0 (15 minutos), correspondiendo los valores máximos a *Pseudomonas* sp. 6 (Tabla 10, figuras 36 a 43).

Con los valores de absorbancia obtenidos por triplicado con diferentes concentraciones de biomasa se obtuvo la ecuación $Y = 0,397x - 0,0062$ (Tabla 11, figura 44), manteniendo como patrón de referencia un coeficiente de determinación $> 0,9$ (Mantilla, 2007).

La biomasa de *Pseudomonas* sp. 6 productora de surfactante osciló entre $3,100 \text{ gL}^{-1}$ a las 96 hasta $4,200 \text{ gL}^{-1}$ a las 48 horas (Tabla 12), alcanzando un rendimiento de biosurfactante en función de la biomasa de $0,83 \text{ gL}^{-1}$ u 83% (Figura 45, tabla 13).



Figura 29. Aislamiento bacteriano 6 desarrollado en agar nutritivo.



Figura 30. Aislamiento bacteriano 9 desarrollado en agar nutritivo.



Figura 31. Pruebas bioquímicas para la identificación fenotípica de bacterias productoras de surfactantes.

Tabla 7

Características diferenciales de bacterias Gram positivas productoras de surfactantes

Características	Aislamientos bacterianos	
	27	28
Tinción de Gram	+	+
Forma	Bacilo	Bacilo
Catalasa	+	+
Hidrólisis de gelatina	Positiva	Positiva
Hidrólisis de almidón	Positiva	Positiva
Utilización del citrato	Positiva	Positiva
Género	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.

Tabla 8

Características diferenciales de bacterias Gram negativas productoras de surfactantes

Características	Aislamientos bacterianos	
	6, 9, 22, 25	21
Tinción de Gram	-	-
Forma	Bacilo	Bacilo
Catalasa	+	+
Fermentación de carbohidratos (TSI)	k/k	A/A
Descarboxilación de lisina (LIA)	Negativo	Positivo
Utilización de citrato como fuente de carbono / energía	+	+
Género	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterobacter</i>



Figura 32. Hongos filamentosos cultivados en agar papa dextrosa.



Figura 33. Observación microscópica (400x) de *Aspergillus* sp.

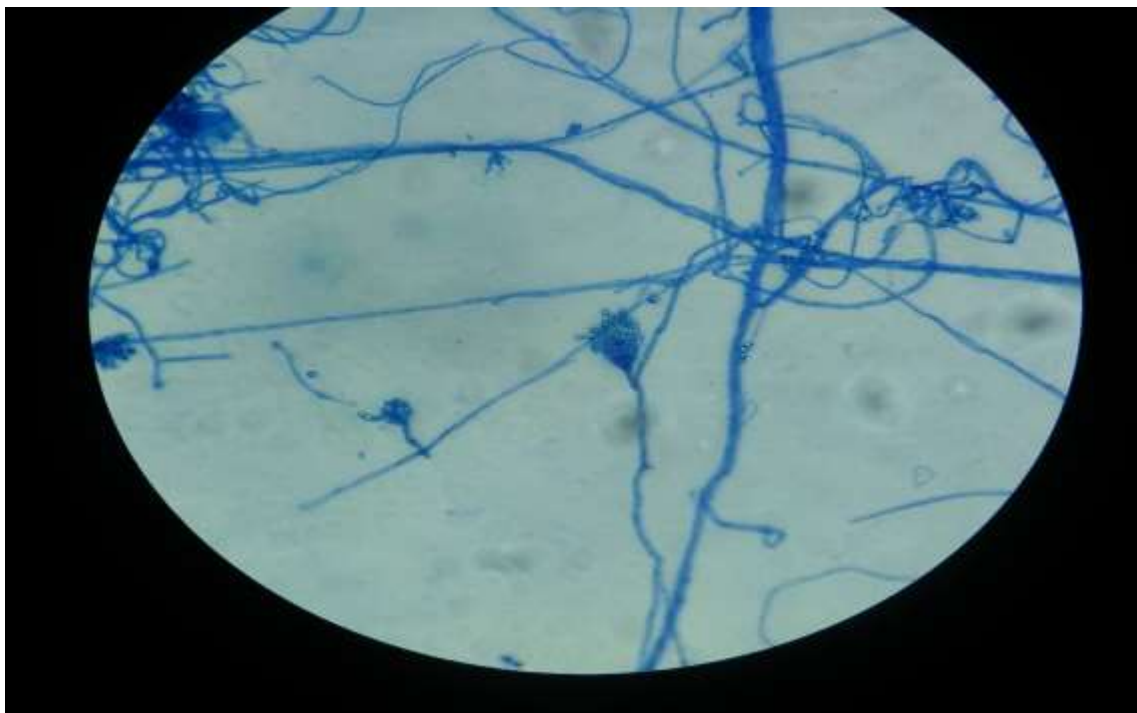


Figura 34. Observación microscópica (400x) de *Penicillium* sp.



Figura 35. Observación microscópica (400x) de *Cunninghamella* sp.

Tabla 9

Diámetro de los halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo producidos por diez microorganismos hidrocarbonoclásticos seleccionados

Microorganismos	Halos* de emulsión (mm)	
	15minutos	30 minutos
<i>Pseudomonas</i> sp. 6	13,67	4,67
<i>Pseudomonas</i> sp. 9	4,33	4,00
<i>Enterobacter</i> sp. 21	9,00	0,33
<i>Pseudomonas</i> sp. 22	9,67	4,00
<i>Pseudomonas</i> sp. 25	8,33	8,00
<i>Bacillus</i> sp. 27	14,00	1,00
<i>Bacillus</i> sp. 28	5,67	3,33
<i>Penicillium</i> sp. 4	7,67	7,33
<i>Aspergillus</i> sp. 13	9,00	7,67
<i>Cunninghamella</i> sp. 21	4,00	1,67

*Promedio de tres repeticiones

Tabla 10

Diámetro de los halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo producidos por diez microorganismos en biorreactores tipo tanque con sistema discontinuo

Microorganismos	Halos* de emulsión (mm)			
	0min	5min	10min	15min
<i>Pseudomonas</i> sp. 6	16,33	16,33	15,00	12,00
<i>Pseudomonas</i> sp.9	8,67	7,67	7,33	5,00
<i>Enterobacter</i> sp. 21	11,00	10,67	9,33	9,00
<i>Pseudomonas</i> sp.22	8,67	8,00	7,00	6,00
<i>Pseudomonas</i> sp. 25	14,33	13,00	11,33	9,67
<i>Bacillus</i> sp. 27	10,33	9,33	8,67	7,67
<i>Bacillus</i> sp. 28	10,67	10,00	9,00	8,00
<i>Penicillium</i> sp. 4	8,33	7,33	6,00	4,67
<i>Aspergillus</i> sp. 13	7,67	7,00	6,00	5,00
<i>Cunninghamella</i> sp. 21	6,33	5,33	4,00	1,33

*Promedio de tres repeticiones



Figura 36. Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por Pseudomonas sp. 6



Figura 37. Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por *Pseudomonas* sp. 9



Figura 38. Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por *Enterobacter* sp. 21



Figura 39. Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por *Pseudomonas* sp. 22

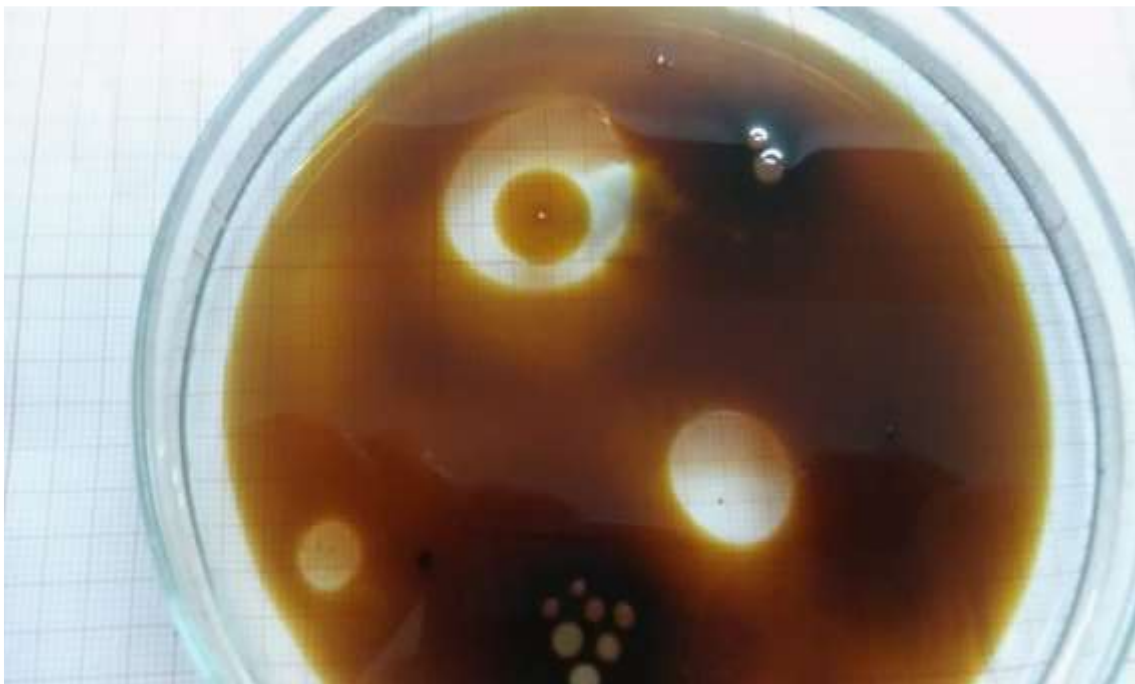


Figura 40. Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por *Pseudomonas* sp. 25

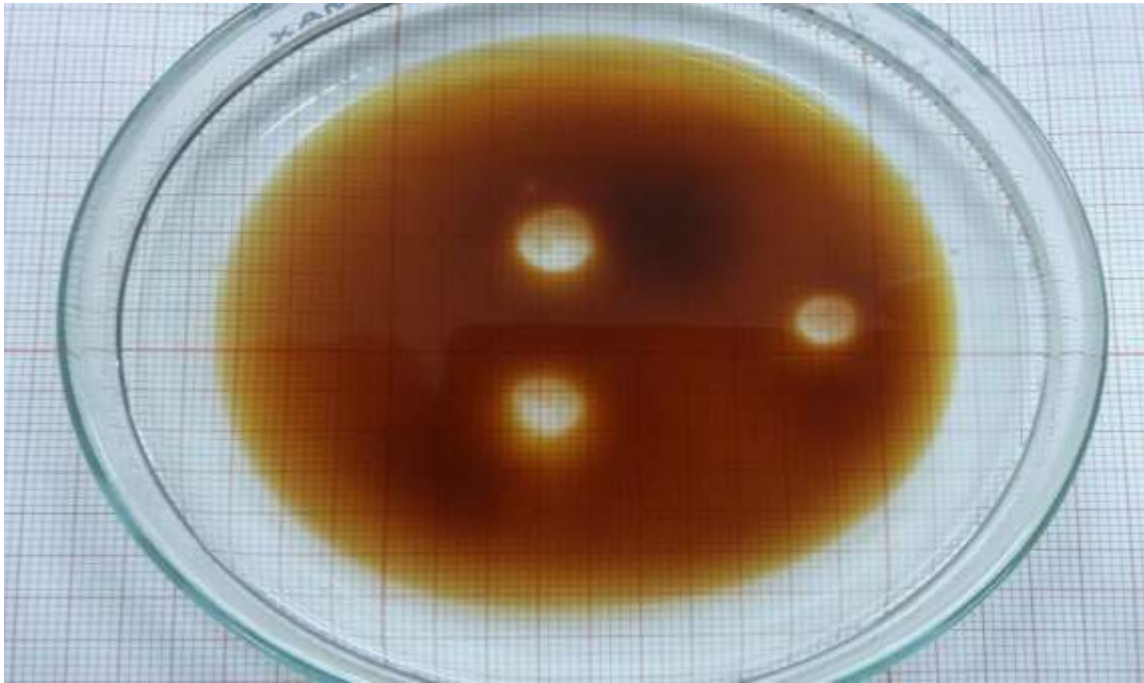


Figura 41 Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por *Bacillus* sp. 27



Figura 42. Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por *Bacillus* sp. 28

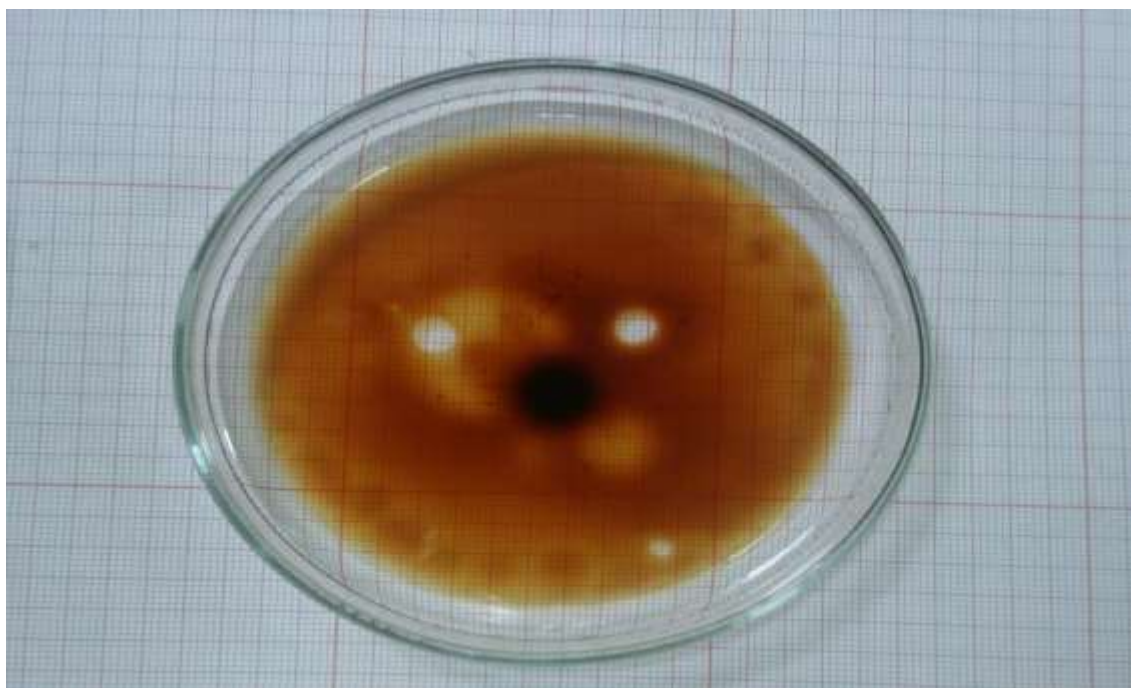


Figura 43. Halos de emulsión de hidrocarburos de petróleo por *Cunninghamella* sp. 21

Tabla 11

Valores de absorbancia (600nm) de biomasa de *Pseudomonas* sp. 6 productora de biosurfactante

Biomasa	Absorbancia*
(gL ⁻¹)	(600nm)
0,26	0,650
0,026	0,160
0,0026	0,024
0,00026	0,002

*Promedio de tres repeticiones

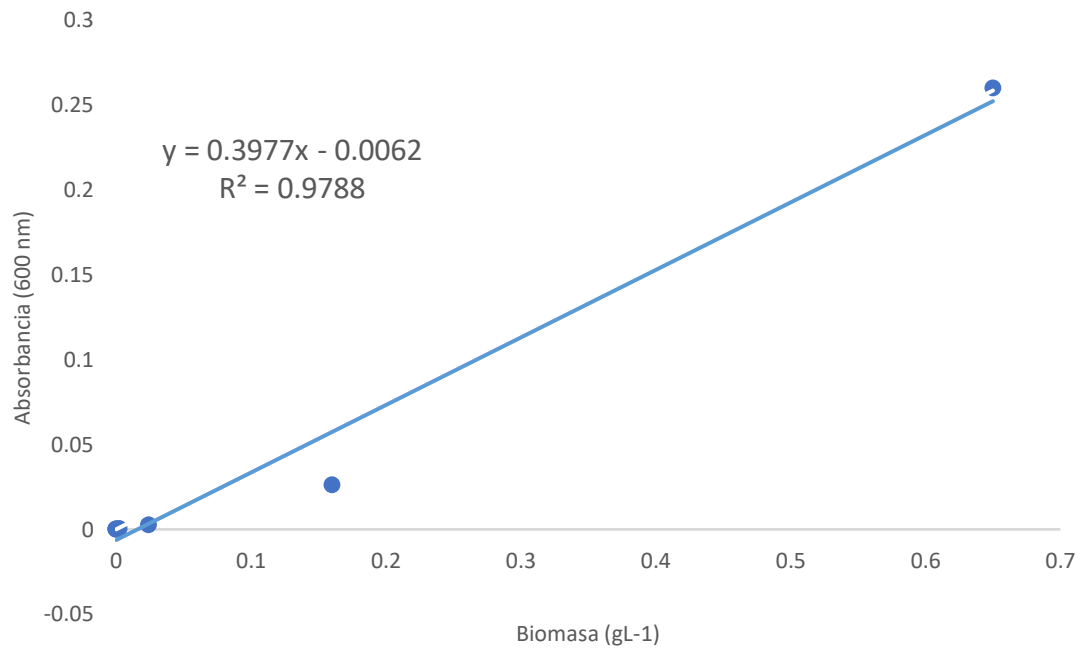


Figura 44. Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de *Pseudomonas* sp. 6 productora de surfactante.

Tabla 12

Absorbancia (600 nm) corregida y biomasa de *Pseudomonas* sp. 6 productora de surfactante en medio mínimo salino de Davis

Tiempo (horas)	Absorbancia (600 nm)	Biomasa (gL ⁻¹)
24	0,678	4,102
48	0,558	4,200
72	0,429	3,109
96	0,404	3,100



Figura 45. Biosurfactante producido por *Pseudomonas* sp. 6.

Tabla 13

Rendimiento de surfactante en función de la biomasa ($Y_{p/x}$) de *Pseudomonas* sp. 6

Parámetro	Valores
Biomasa X (g L^{-1})	3,10
Producto surfactante P (g L^{-1})	2,60
Rendimiento $Y_{p/x}$ (g L^{-1})	0,83
Rendimiento $Y_{p/x}$ (%)	83

V. DISCUSIÓN

Las borras presentaron TPH y metales, contaminantes que evidenciaron su toxicidad al disminuir el índice de germinación de las semillas de rabanito, con un nivel severo de toxicidad (Contreras & Carreño, 2018). Las borras o lodos aceitosos tienen una elevada concentración de hidrocarburos, por lo que son consideradas residuos peligrosos y recalcitrantes (Zhang et al., 2011); no obstante, constituyen un hábitat apropiado para los microorganismos hidrocarbonoclásticos (Cerqueira et al., 2011; Zhang et al., 2011).

Los lugares de almacenamiento de TPH o productos derivados del petróleo están expuestos a contaminación bacteriana. Estos microorganismos pueden modificar la calidad del producto, cambiar la viscosidad, beneficiar a las bacterias reductoras del azufre y del hierro y acelerar la corrosión de los equipos, a tal punto que las compañías de almacenamiento y transporte utilizan biocidas para evitar la proliferación de bacterias (Hamed et al., 2013).

Los microorganismos aislados en las borras de hidrocarburos son hidrocarbonoclásticos, capaces de utilizar los TPH como fuente de carbono y energía (Hamed et al., 2013). En lodos aceitosos provenientes de lavaderos de carros se aislaron e identificaron como hidrocarbonoclásticas bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas* y los hongos *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp. y *Trichoderma* spp. (Vásquez et al., 2010). En lodos aceitosos de una planta industrial de petroquímicos o borras se identificaron *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus megaterium*, *B. cibi* (Cerqueira et al., 2011) y *Luteibacter* sp. (Zhang et al., 2011).

Los surfactantes favorecen la disponibilidad de los TPH (Jiménez et al., 2010). Los microorganismos con frecuencia producen biosurfactantes y bioemulsificadores que favorecen el acceso a los hidrocarburos y aceleran su

utilización como fuente de carbono (Bhattacharya et al., 2019). La degradación extracelular de los hidrocarburos se atribuye a los biosurfactantes microbianos (Ke et al., 2019), compuestos que son producidos por bacterias (Bhattacharya et al., 2019), levaduras y hongos filamentosos (Covalcante et al., 2015). En este contexto, la reducción de la tensión superficial es un criterio utilizado para la selección de microorganismos productores de biosurfactantes (Deepika et al., 2016).

La detección y selección de microorganismos productores de surfactantes mediante la dispersión de gota coincide con Sharma et al. (2018). Esta prueba o “test del desplazamiento del aceite” (Deepika et al., 2016), en el que se forma un halo de emulsión sobre una capa ligera de hidrocarburo, es utilizada para seleccionar microorganismos productores de surfactantes (Sharma et al., 2018) o para caracterizar el surfactante recuperado (Deepika et al., 2016)

El 18,86% de los microorganismos hidrocarbonoclásticos demostraron ser productores de surfactantes, superando 16,6% reportado por Sharma et al. (2018) en microorganismos aislados de suelo previamente enriquecido. El diámetro de los halos de emulsión alcanzó 18,33 mm, superando 12 mm reportados por Mondragón (2011).

Los biosurfactantes favorecen la emulsificación y solubilización de compuestos insolubles en fases acuosas, facilitando su disponibilidad para el crecimiento y mantenimiento microbiano, adherencia y liberación de las células en la superficie y transporte de los hidrocarburos en la membrana celular (Jiménez et al., 2010). La producción de surfactantes por los géneros microbianos en la presente investigación fue reportada previamente: *Pseudomonas aeruginosa* (Deepika et al., 2016), *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* (Sharma et al., 2018), *B. cereus* (Bhattacharya et al., 2019), *Enterobacter* sp. (Batista, Albuquerque, Ferreira, Veiga & Pereira, 2019), *Penicillium* sp. (Martínez, Hernández, Ojeda & García, 2011), *Aspergillus* sp. (Seghal et al., 2010) y *Cunninghamella* sp. (Andrade et al., 2014).

La remediación de lugares contaminados con TPH se basa en el uso de microorganismos hidrocarbonoclásticos; no obstante, los contaminantes de la fase líquida no acuosa absorbidos en la matriz del suelo no están disponibles,

limitándose la tasa de degradación microbiana (Riojas, Torres, Mondaca, Balderas & Gortáres, 2010). En este contexto, los microorganismos productores de surfactantes son eficientes en la biorremediación de suelo contaminado con TPH (Bhattacharya et al., 2019), lodos aceitosos o borras (Zhang et al., 2011; Cerqueira et al., 2011) y también para la recuperación mejorada de hidrocarburos por microorganismos (microbial enhanced oil recovery, MEOR) mediante técnicas *in situ* y *ex situ* (Geetha et al., 2018).

VI. CONCLUSIONES

6.1 Las borras de hidrocarburos de la refinería Talara de Graña y Montero Petrolera, (GMP) presentaron TPH, microorganismos totales e hidrocarbonoclasticos y severa toxicidad en la germinación de semillas de *Raphanus sativus* L.

6.2 El 62,33% de las bacterias y el 37,66% de los hongos aislados de borras demostraron ser hidrocarbonoclasticos.

6.3 El 62,33% de las bacterias y el 37,66% de los hongos hidrocarbonoclasticos demostraron ser productores de surfactantes.

6.4 El rendimiento de surfactante en función de la biomasa de *Pseudomonas* sp. 6. seleccionada fue de 83%.

VII. RECOMENDACIONES

- 7.1** Identificar las características físicas, químicas y biológicas del surfactante producido por *Pseudomonas* sp. 6
- 7.2** Determinar el efecto de los microorganismos productores de surfactante en la biorremediación de suelo contaminado con borras de hidrocarburos a nivel de microcosmos y de parcelas demostrativas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahumada, M & Gómez, R (2009). *Evaluación y selección de bacterias degradadoras de fenol por respirometría* (tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8226/tesis220.pdf?sequence=1>
- Alexander, M. (1944). *Introducción a la Microbiología del Suelo*. México: Editorial AGT SA.
- Andrade, N., Luna, M., Santiago, A., Franco, L., Silva, G., de Souza, P., ... y Campos, G. (2014). Biosurfactante y bioemulsionante producido por una prometedora *Cunninghamella echinulata* aislada del suelo caatinga en el noreste de Brasil. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 15 (9), 15377-15395. doi: 10.3390 / ijms15091537
- Ayasta, J. & Bernable, C. (2012). *Mejoramiento del proceso de compostaje de residuos sólidos urbanos biodegradables del distrito de Ciudad de Eten, en Lambayeque, Julio a diciembre de 2011* (tesis de grado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Barnett, H. & Hunter, B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. (4 ed). St. Paul, Minesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Batista, I., Albuquerque, C., Ferreira, F., Veiga, V. & Pereira, J. (2019). Potencial para produção de biossurfactantes em bactérias isoladas de macrófita aquática na Amazônia. *Marupiará| Revista Científica do CESP/UEA*, (1). doi: 177.66.14.82/bitstream/riuea/1198/1
- Bhattacharya, M., Guchhait, S., Biswas, D., & Singh, R. (2019). Evaluation of a microbial consortium for crude oil spill bioremediation and its potential uses in enhanced oil recovery. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101034. doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101034

- Burgos, C. Pons, R., Espuny, M., Aranda, F., Teruel, J., Manresa, A.... & Márquez, A. (2011). *Aislamiento y caracterización parcial de una mezcla de biotensioactivos producidos por Sphingobacterium detergens sp. nov. aisladas de suelo. Journal of Colloid and Interface Science*, 361, 195-204.
- Carrasco, M & Ore, J. (2000). *Tratamiento de las borras ácidas producidas en la manufactura de las bases lubricantes del tipo L.C.T. en la refinería Talara Perú. Revista INGENIERIA*, 7(1), 1-14. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/707/70770105.pdf>
- Cavalcante, A., Simiqueli, A., de Andrade, C., Ghiselli, G., & Pastore, G. (2015). Optimized production of biosurfactant from *Pseudozyma tsukubaensis* using cassava wastewater and consecutive production of galactooligosaccharides: an integrated process. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 535-542. doi.org/10.1016/j.bcab.2015.10.001
- Cerqueira, V., Hollenbach, E., Maboni, F., Vainstein, M., Camargo, F., Peralba, M., & Bento, F. (2011). Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology*, 102(23), 11003-11010. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.074
- Contreras, H., & Carreño, C. (2018). Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 1(1), 27-33. doi.org/10.25127/ucni.v1i1.269
- Das, N. & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 1-13. doi: 10.4061 / 2011/941810
- Deepika, K., Kalam, S., Sridhar, P., Podile, A., & Bramhachari, P. (2016). Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, 38-47. doi.org/10.1016/j.bcab.2015.11.006
- Dorán, P. (1998). *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. España: Editorial Acribia, S.A.
- Geetha, S., Banat, I. & Joshi, S. (2018). Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 23-32. doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.010

- Gómez, L. & Gómez, M. (2016). Métodos utilizados para el tratamiento de las borras de tanques de almacenamiento en la industria del petróleo. Recuperado de: http://bibliotecadigital.usb.edu.co/bitstream/10819/2867/1/M%C3%A9todos%20utilizados%20tratamiento_G%C3%B3mez_2015.pdf.
- Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C. & Casos, I. (2017) Producción de polihidroxicanoatos por bacterias halófilas nativas utilizando almidón de cáscaras de Solanum tuberosum L. *Scientia Agropecuaria*, 8 (2), 109 – 118. doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.02.03
- Hamed, S., Ali, Z., Rezgui, R., Ghram, A., Maaroufi, A. & Labat, M. (2013). Diversity of culturable aerobic bacteria colonizing four petroleum by-products storage reservoirs. *African Journal of Microbiology Research*, 7(21), 2542-2549. doi: 10.5897/AJMR12.1586
- 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://repositorio.uni.pe/bitstream/uni/1284/1/herrera_pb.pdf
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P. & Staley, J. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, (9thed). Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins.
- Ibrahim, H. (2016). Biodegradation of used engine oil by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 isolated from oil-contaminated soil. *3 Biotech*, 6 (226), 1-13. doi.org/10.1007/s13205-016-0540-5
- Ismail, W., Van Hamme, J., Kilbane, J. & Gu, J. (2017). Biotecnología microbiana del petróleo: desafíos y perspectivas. *Frontiers in Microbiology*, 8, 833. doi: 10.3389/fmicb.2017.00833
- Jain, P., Gupta, V., Gaur, R., Lowry, M., Jaroli, D. & Chauhan, U. (2011). Bioremediation of petroleum oil contaminated soil and water. *Research Journal of Environmental Toxicology*, 5(1), 1-26. doi: 10.3923 / rjet.2011.1.26
- Jiménez, D., Medina, S. & Gracida, J. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensioactivos: una revisión. *Revista internacional de Contaminación Ambiental*, 26(1), 65-84. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018849992010000100006&script=sci_arttext&lng=pt

- Ke, C., Lu, G., Wei, Y., Sun, W., Hui, J., Zheng, X., ... & Zhang, X. (2019). Biodegradation of crude oil by *Chelatococcus daeguensis* HB-4 and its potential for microbial enhanced oil recovery (MEOR) in heavy oil reservoirs. *Bioresource Technology*, 287, 121442. doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121442
- Martínez, J., Hernández, M., Ojeda, M. & García, M. (2011). Condiciones ambientales y de nutrientes óptimos para el desarrollo del microorganismo hidrocarbonoclasta *Penicillium* sp. in vitro. Recuperado de: <http://repositorio.ugm.cl/bitstream/handle/12345/1326/Condiciones%20ambientales%20y%20de%20nutrientes%20%c3%b3ptimos%20para%20el%20desarrollo%20del.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mondragón, L. (2011). *Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autóctonas de yacimientos petroleros productores de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de MEOR*. (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, México. Recuperado de: <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8140/1/TESIS%20LMM.pdf>
- Ministerio del Ambiente (2017). Decreto Supremo N° 011-2017- MINAM del 2 de diciembre de 2017, por el cual se aprueban los estándares de calidad ambiental (ECA) para suelo. Lima, Perú: Ministerio del Ambiente.
- Narváez, S., Gómez, M & Martínez, M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano. *Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras, INVEMAR*, 37(1), 63-77.
- Pérez, J., Anaya, O., Chang, C., Membrillo, I. & Calva, G. (2010). *Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno crecidas en hidrocarburos*. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 41, 1-9.
- 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.
- Riojas, H., Torres, L., Mondaca, I., Balderas J. & Gortáres, P. (2010). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva*, 9(3), 120-145. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/863/86315692003.pdf>
- Rodríguez, C. (2012). *Producción de biogas a partir del bagazo cervecero*. (Tesis de Pregrado). Universidad de Chile, Santiago, Chile.

- 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 contaminadas con crudo de la parroquia San Carlos, provincia de Orellana, bajo condiciones aerobias y anaerobias*. (tesis de grado). Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador.
- Seghal, G., Thajuddin, N., Hema, T., Idhayadhulla, A., Surendar, R. & Selvin, J. (2010). Optimization and characterization of rhamnolipid biosurfactant from sponge associated marine fungi *Aspergillus* sp. MSF1. *Desalination and Water Treatment*, 24(1-3), 257-265. doi: 10.5004/dwt.2010.1569
- Sharma, R., Singh, J., & Verma, N. (2018). Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 132-139. doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.028
- Suárez, L. (2011). *Desarrollo de un método químico para recuperación de crudo a partir de las borras generadas en los procesos de mantenimiento de tanques y tuberías en distritos de producción petroleros de Colombia*. (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.
- Sulbarán, M., Bahsas, A., Velásquez, W. & Otoniel, J. (2005). *Caracterización de biosurfactantes producidas por Pseudomonas fluorescentes aisladas de emulsiones de petróleo pesado*. *CIENCIA*, 13 (2), 228-239.
- Tahhan, R. & Abu-Ateih, R. (2009). Biodegradation of petroleum industry oily-sludge using Jordanian oil refinery contaminateds oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 1054-1060.
- Torres, K. & Zuluaga, T. (2001). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Valle, M. (2014). *Análisis y evaluación de la biodegradación de petróleo crudo, a nivel de laboratorio mediante bacterias nativas aisladas de suelo de la provincia de Sucumbío, Cantón Lago Agrio, Ecuador*. Universidad de las Fuerzas Armadas, ESPE, Ecuador.
- Vásquez, M., Figueroa, J. & Quintero, A. (2010). Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 141-157. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/776/77617786014.pdf>

- Vega, H. & Ugaz, R. (2016). *Rendimiento de surfactantes producidos por Pseudomonas spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo, 2015*. (tesis de grado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Villareal, 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.
- Vivanco, L. (2013). *Degradación de petróleo en suelos contaminados con Borra de la Refinería Talara utilizando microorganismos autóctonos y compost*. (tesis de grado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Wikipedia. (2017). Provincia de Talara. Recuperado de: https://es.wikipedia.org/wiki/Provincia_de_Talara.
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., ... & Yu, H. (2018). Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: A perspective analysis. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-11. doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885
- Zhang, J., Li, J., Chen, L. & Thring, R. (2011). Remediation of refinery oily sludge using isolated strain and biosurfactant. *International Symposium on Water Resource and Environmental Protection* IEEE. 3, 1649-1653. doi: 10.1109 / ISWREP.2011.5893355

ANEXOS

ANEXO A**Caldo Bushnell Haas (g L^{-1}) para el enriquecimiento de muestras de borras
de hidrocarburos (en Contreras & Carreño, 2018)**

KH_2PO_4	1,0
K_2HPO_4	1,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0
MgSO_4	0,20
Cl_2Ca	0,02
FeCl_3	0,005
Agua destilada csp	1000 mL
pH	7,0

ANEXO B

Composición (gL⁻¹) de medios de cultivo para el aislamiento de microorganismo de borras de hidrocarburos de petróleo (en Contreras & Carreño, 2018).

a) agar nutritivo, AN

Peptona_____5,0

Extracto de carne_____3,0

Agar agar_____15,0

Agua destilada_____1000mL

b) agar papa dextrosa, PDA

Infusión de papa_____250g

Sacarosa_____20g

Agar-agar_____15g

ANEXO C**Medio mínimo salino de Davis (g L^{-1}) para la producción de surfactantes (en Mondragón, 2011)**

KH_2PO_4	5,23
K_2HPO_4	1,91
MgSO_4	0,09
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,00
Glicerol	1 mL

Solución de elementos traza* 1 mL

*20 mg L^{-1} CoCl_2 , 30 mg L^{-1} H_3BO_3 , 10 mg L^{-1} ZnSO_4 , 1 mg L^{-1} CuSO_4 , 3 mg L^{-1} Na_2MoO_4 , 10 mg L^{-1} FeSO_4 , 2,6 mg L^{-1} MgSO_4