



UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO"
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**"Rendimiento de surfactantes producidos por bacterias
degradadoras de hidrocarburos de petróleo, 2015"**

TESIS

Para optar el Título Profesional de:
LICENCIADO EN
BIOLOGÍA–MICROBIOLOGÍA–PARASITOLOGÍA

Presentado por:

Br. Gianfranco Román Asalde Chozo

Br. Kenny Jefferson Enríquez Méndez

LAMBAYEQUE–PERÚ

2016

**“Rendimiento de surfactantes producidos por bacterias
degradadoras de hidrocarburos de petróleo, 2015”**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA–MICROBIOLOGÍA–PARASITOLOGÍA**

APROBADO POR:

Dr. Eduardo Julio Tejada Sánchez

PRESIDENTE

Dr. Cesar García Espinoza

SECRETARIO

Lic. Julio César Silva Estela

VOCAL

Dra. Carmen Carreño Farfán

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2016

DEDICATORIA

A DIOS, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A MIS PADRES, Román y Teresa, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me han permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

Gianfranco Román Asalde Chozo

Dedico esta tesis a Dios ya que con su infinito amor y bondad me protege y me pone a prueba en diferentes obstáculos, ayudándome a aprender de mis errores y a mejorar como ser humano, permitiéndome disfrutar todos mis logros, que son el resultado de su ayuda.

A mis padres Jorge Luis Enríquez Morales y Blanca Flor Méndez Cáceres porque ellos siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo incondicional. Me han formado con grandes valores, principios y me incentivaron a ser perseverante para conseguir mis objetivos.

Kenny Jefferson Enríquez Méndez

AGRADECIMIENTO

- A Dios por darnos la oportunidad de vivir y por estar en cada paso que damos, por fortalecer nuestro corazón e iluminar nuestra mente.
- A nuestros padres por ser el pilar fundamental en todo lo que somos, en toda nuestra educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.
- Nuestro más sincero agradecimiento a la Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán, por su amistad, consejos, comprensión, su paciencia como orientadora y por el gran apoyo incondicional en el desarrollo del presente trabajo.

Índice

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	4
2.1	Antecedentes de la investigación.....	4
2.2	Base teórica.....	7
2.2.1	Biosurfactantes.....	10
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1	Material.....	12
3.2	Población y muestra de estudio.....	12
3.3	Métodos.....	12
3.3.1	Variable en estudio.....	12
3.3.2	Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	12
3.3.3	Primera fase: Aislamiento y selección de bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo.....	13
a)	Lugar de muestreo.....	13
b)	Obtención de muestras de suelo.....	13
c)	Análisis químico y microbiológico de suelo contaminado.....	13
d)	Toxicidad de contaminantes de suelo	18
e)	Aislamiento de bacterias heterótrofas cultivables.....	19
f)	Caracterización de bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo.....	19
g)	Caracterización morfológica de bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo.....	21
3.3.4	Segunda fase: Rendimiento de surfactantes producidos por las bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo.....	21
a)	Prueba de dispersión en gota.....	21
b)	Rendimiento de surfactantes.....	24

b.1	Proceso productivo.....	24
b.2	Cuantificación de biomasa por turbidimetria.....	24
b.3	Recuperación y cuantificación del biosurfactante.....	27
b.4	Cálculo del rendimiento.....	30
c)	Identificación fenotípica del género de las bacterias productoras de surfactantes.....	30
d)	Conservación de bacterias nativas productoras de surfactantes.....	30
e)	Análisis de los datos.....	30
IV.	RESULTADOS.....	31
4.1	Características químicas, microbiológicas y toxicidad de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo crudo liviano.....	31
4.2	Bacterias heterótrofas cultivables aisladas de suelo contaminado.....	31
4.3	Bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo caracterizadas.....	31
4.4	Bacterias productoras de surfactantes seleccionadas.....	37
4.5	Biosurfactante producido y coeficiente de rendimiento de bacterias identificadas.....	37
V.	DISCUSIÓN.....	47
VI.	CONCLUSIONES.....	52
VII.	RECOMENDACIONES	53
VIII.	RESUMEN.....	54
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	55
X.	ANEXOS.....	60

Índice de tablas

Tabla 1.	Posición de los puntos de muestro de los suelos contaminados con petróleo crudo en el lote III de la empresa Interoil Perú S. A. en Piura, 2014.....	15
Tabla 2.	Contenido de hidrocarburos totales, HTP y número más probable, NMP, de microorganismos totales e hidrocarbonoclasticos en suelo contaminando con petróleo crudo liviano.....	32
Tabla 3.	Nivel de toxicidad de suelo contaminado con petróleo crudo liviano determinado en <i>Raphanus sativus</i> L.....	32
Tabla 4.	Bacterias heterótrofas aisladas en muestras de suelo contaminado con petróleo crudo liviano.....	33
Tabla 5.	Tiempo requerido para la utilización de petróleo crudo liviano como fuente de carbono y energía por bacterias aisladas de suelo contaminado en Talara.....	35
Tabla 6.	Frecuencia de bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo según morfología y disposición celular.....	36
Tabla 7.	Diámetro del halo de dispersión de petróleo crudo liviano por efecto de medio mínimo salino de Davis cultivado con bacterias degradadoras.....	39
Tabla 8.	Diámetro del halo de dispersión de petróleo crudo liviano por efecto de medio A cultivado con bacterias degradadoras.....	41
Tabla 9.	Valores de absorbancia (600 nm) de biomasa de bacterias productoras de biosurfactantes.....	42

Tabla 10.	Absorbancia (600 nm) corregida de biomasa de bacterias productoras de surfactantes en medio mínimo salino de Davis.....	43
Tabla 11.	Concentración (gL ⁻¹) de biomasa de bacterias productoras de surfactantes en medio mínimo salino de Davis.....	43
Tabla 12.	Biomasa y diámetro del halo de dispersión de bacterias productoras de surfactantes.....	44
Tabla 13	Características diferenciales de géneros de bacterias productoras de surfactantes seleccionadas.....	
Tabla 14.	Rendimiento Y (p/x) de surfactantes producidos por bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo.....	46

Índice de figuras

Figura 1.	Ubicación del lugar de muestreo correspondiente a los lotes III y IV de la Empresa Interoil Perú S.A. en la provincia de Talara, región Piura.....	14
Figura 2.	Muestras de suelo contaminado con petróleo crudo.....	16
Figura 3.	Técnica del cuarteo y amontonamiento de muestra de suelo contaminado.....	16
Figura 4	Bacterias heterótrofas desarrolladas en agar nutritivo y agar Mac Conkey	20
Figura 5.	Cultivos de bacterias heterótrofas aisladas de suelo contaminado con petróleo.....	20
Figura 6.	Caldo Bushnell Hass, inoculado con bacterias heterótrofas aisladas de suelo contaminado con petróleo.....	22
Figura 7.	Viraje del indicador púrpura de bromocresol al amarillo en caldo Bushnell Hass.....	22
Figura 8.	Medios cultivados con bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo.....	23
Figura 9.	Papel milimetrado debajo de placas de Petri con agua destilada.....	25
Figura 10.	Placas de Petri con agua destilada y capa superficial homogénea de petróleo crudo liviano.....	25
Figura 11.	Jeringa de 1 mL acondicionada con tip.....	26
Figura 12.	Gotas de sobrenadante de cultivo bacteriano sobre capa superficial de petróleo crudo liviano.....	26
Figura 13.	Pesaje de la biomasa de bacterias.....	28

Figura 14.	Sobrenadante acidificado del cultivo bacteriano y acetato de etilo en pera de decantación.....	28
Figura 15.	Acetato de etilo conteniendo el biosurfactante recuperado después de tres extracciones sucesivas.....	29
Figura 16.	Pesaje de biosurfactante recuperado.....	29
Figura 17.	Porcentaje de bacterias de Lote III-Talara, que utilizaron petróleo crudo liviano como fuente de carbono y energía.....	34
Figura 18.	Frecuencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas degradadoras de hidrocarburos de petróleo.....	36
Figura 19.	Frecuencia de cultivos bacterianos según crecimiento en medio mínimo salino de Davis y medio A.....	38
Figura 20.	Halo de dispersión de petróleo crudo liviano con medio mínimo salino de Davis cultivado con bacterias degradadoras de hidrocarburos.....	38
Figura 21.	Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de bacterias productoras de surfactantes.....	42

Rendimiento de surfactantes producidos por bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo, 2015

Gianfranco Asalde, Kenny Enriquez, Carmen Carreño

Resumen

La biodegradación de hidrocarburos de petróleo es favorecida por la producción de biosurfactantes, no contaminantes del ambiente. El objetivo de la presente investigación fue determinar el rendimiento de surfactantes producidos por bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo. Se colectaron muestras de suelo contaminado y las bacterias aisladas en agar nutritivo y Mac Conkey se consideraron degradadoras cuando utilizaron el petróleo como fuente de carbono y energía. Las bacterias productoras de surfactantes se seleccionaron mediante la prueba de dispersión en gota con los medios mínimo salino de Davis con 1% de glicerol y medio A con glucosa como fuente de carbono y con las tres bacterias que alcanzaron el mayor diámetro en el halo se determinó el rendimiento. En el suelo con un HTP de 21 200 mg Kg⁻¹ se obtuvieron 176 aislados de bacterias, entre los que 86,36% utilizó el petróleo como fuente de carbono y energía. El 95,39% de estas bacterias desarrollaron en medio mínimo con producción de biosurfactante, evidenciado por los halos de dispersión de petróleo liviano, con diámetros de 1,6-39,6 mm al inicio y 2,0-30 mm después de 5 minutos. El coeficiente máximo de rendimiento de surfactantes Y (p/x) fue de 0,053 gL⁻¹ con *Sphingobacterium* sp. 64M. La producción de surfactante y la capacidad para degradar hidrocarburos de petróleo demostró el potencial de las bacterias para la biorremediación de suelos contaminados.

Palabras clave: hidrocarburos de petróleo, biosurfactantes, *Sphingobacterium*

I. INTRODUCCIÓN

El petróleo es un elemento clave para las actividades humanas, como fuente de energía y como materia prima para la producción de diversos compuestos; sin embargo, la industria petrolera enfrenta graves problemas como la contaminación que ella misma produce y la baja eficiencia en la extracción del petróleo de sus reservorios naturales (Raiger & López, 2009). En el suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando procesos físico-químicos simultáneos como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad de vertido pueden ser más o menos lentos, ocasionando una mayor toxicidad (López *et al.*, 2006). Asimismo, en el suelo, la adsorción inmoviliza el petróleo y disminuye su toxicidad, pero aumenta su longevidad y permanencia. A su vez, con su desplazamiento se alcanzan las aguas subterráneas, desfavoreciendo su uso para la agricultura y actividades humanas (Braibant, 2004).

Debido al impacto ambiental negativo de hidrocarburos de petróleo se requiere el uso de técnicas para su eliminación, entre las que se considera la biorremediación. La remediación de sitios contaminados se basa en el uso de microorganismos, capaces de degradar el petróleo y derivados mediante la utilización de estrategias como la bioaumentación y bioestimulación; sin embargo, los contaminantes presentes en la fase líquida no acuosa (NAPL, por sus siglas en inglés) o absorbidos en la matriz del suelo no están disponibles, por lo que la tasa de degradación microbiana es a menudo limitada por problemas de transferencia de masa (Riojas *et al.*, 2010).

Para favorecer la degradación del petróleo y también para facilitar su extracción de los yacimientos, es importante aumentar su movilización y solubilización en medio acuoso y para ello se propone el uso de surfactantes. Éstos son moléculas anfipáticas, que tienen una fracción de cabeza polar hidrofílica y una cola hidrofóbica o fracción no polar, por lo que poseen la capacidad de interaccionar con los compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos a la vez y por lo tanto, ubicarse en la interfase de los mismos (Burgos, 2012). Esta afinidad por las interfases, les otorga las características de disminuir la tensión superficial e interfacial y aumentar la solubilidad y biodisponibilidad del contaminante; no obstante, la mayoría de surfactantes de síntesis química, presentan alta toxicidad y resistencia a la biodegradación, por lo que se acumulan en el ambiente (Raiger & López, 2009).

Los surfactantes, sintetizados por las bacterias presentan bajos valores de concentración micelar crítica (CMC), gran actividad superficial, con adsorción gradual y actividad continuada, por lo que su eficacia se equipara y en algunos casos sobrepasa a los surfactantes químicos (Burgos, 2012). Además, son biocompatibles, de baja toxicidad y biodegradables; sin embargo, la producción es un proceso que no compite económicamente, por lo que se requiere aislar bacterias con un elevado rendimiento para disminuir los costos (Riojas *et al.*, 2010). Una eficiente estrategia es el aislamiento y caracterización de estas bacterias en lugares contaminados (Burgos, 2012). En la actualidad no existe disponibilidad de estos microorganismos que puedan ser utilizados para mejorar la biorremediación de ambientes impactados con petróleo o para la producción de biosurfactantes a gran escala y bajo costo.

Los lugares contaminados con petróleo como el lote III de la empresa Interoil Perú S.A. tiene una diversidad biológica que puede ser investigada (Galindo & Llontop, 2015), para la búsqueda de bacterias degradadoras de petróleo, adaptadas a las condiciones ecológicas y por lo tanto eficaces y eficientes. Se presenta una importante oportunidad para obtener bacterias productoras de surfactantes, que posteriormente puedan formar parte de un paquete tecnológico propio, permitiendo la disminución de la dependencia

técnica-económica del país y el desarrollo de las capacidades de la población peruana.

La selección de bacterias productoras de surfactantes, antes de ser incorporadas en los ambientes impactados, permitirá asegurar su efectividad en las condiciones climáticas de la región, así como la competitividad y establecimiento frente a la microbiota nativa, a la vez que se beneficia la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo. En este contexto, se planteó la siguiente investigación, cuyo problema fue ¿Cuál es el rendimiento de surfactantes producidos por bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo?

El objetivo general fue: Determinar el rendimiento de surfactantes producidos por bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo. Los objetivos específicos fueron: Determinar las características químicas, microbiológicas y toxicidad del suelo contaminado, aislar bacterias heterótrofas cultivables, caracterizar las bacterias degradadoras con base al tiempo requerido para la utilización del petróleo como fuente de carbono y energía, seleccionar bacterias productoras de surfactantes, producir y recuperar los biosurfactantes, determinar el coeficiente de rendimiento de biosurfactantes e identificar fenotípicamente las bacterias con el mayor rendimiento de surfactantes. La hipótesis planteada fue: Las bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo alcanzan un rendimiento de surfactantes mayor de 5%.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Con el objetivo de investigar biotensioactivos bacterianos se colectaron diez muestras de suelo volcánico, aislando 54 bacterias y seleccionando *Sphingobacterium* sp. por su capacidad para disminuir la tensión superficial e interfacial del medio de cultivo. En medio G-MSM suplementado con n-alcanos cultivado con *Sphingobacterium* se redujo la tensión superficial de 55 mN/m a 32 mN/m. Después de 48 horas se obtuvieron 3,8 mg de biomasa proteica mL⁻¹ y 190 mg L⁻¹ de extracto orgánico, constituido por lípidos (71,6%), carbohidratos (5,6%) y proteínas (4,4%). El porcentaje de emulsión (%E₂₄) del sobrenadante del medio de cultivo se mantuvo en 65-70% durante 5 días y disminuyó (60-65%) después de 1 mes, considerándose un biotensioactivo con potencial industrial (Burgos *et al.*, 2011).

Los biosurfactantes son de gran importancia en la tecnología de biorremediación. Se estudiaron 12 aislados de bacterias de suelos contaminados con petróleo, seleccionándose cuatro fijadoras de nitrógeno con capacidad de crecimiento en queroseno como única fuente de carbono. La producción de biosurfactante fue evaluada mediante la determinación de la tensión superficial (TS) e índice de emulsificación (IE₂₄). La variación en la producción fue atribuida a la especificidad metabólica de cada bacteria, alcanzando 0,35 y 0,5 gL⁻¹ de productividad. El análisis de cromatografía en capa fina (TLC) demostró que el surfactante pertenecía al grupo polimérico de los ramnolípidos. Se concluyó que las bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelos contaminados con petróleo producen biosurfactantes, por lo que son de utilidad para la biorremediación (Pérez *et al.*, 2010).

Sphingobacterium detergens cultivado en sales minerales alcanzó 68 gL⁻¹ de extracto orgánico y 0,57 mg de biomasa proteica mL⁻¹, valores que representaron un bajo rendimiento en la producción de biotensioactivos y que justificaron la optimización de las condiciones de cultivo. Se obtuvo mayor crecimiento y extracto con 0,88 gL⁻¹ de urea como fuente de nitrógeno y con el incremento de 1/0,5 a 2/1 gL⁻¹ en la concentración de fosfato K₂HPO₄/KH₂PO₄. También se determinó que las concentraciones de FeSO₄·7H₂O, MgSO₄, KCl y CaCl no afectaron la producción. Al contrario, el cometabolismo glucosa (20 gL⁻¹) y diferentes n-alcanos permitieron una mayor reducción de la tensión superficial y aumento del extracto orgánico, obteniéndose 250 gL⁻¹. Al modificar la estrategia de cultivo se alcanzaron 466 mgL⁻¹ de extracto orgánico, lo que representó un incremento de siete veces el valor inicial (Burgos *et al.*, 2011).

Los biosurfactantes producidos por microorganismos presentan una alta actividad de superficie y propiedades emulsificantes, además de tener baja toxicidad y ser biodegradables. Se estudió la producción de biosurfactantes por *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de emulsiones de petróleo pesado. Los compuestos fueron detectados mediante el registro de la disminución de la tensión superficial de los cultivos, actividad hemolítica y emulsificante. Se caracterizaron mediante determinación de azúcares y de proteínas, espectroscopía de infrarrojo IRTF y espectroscopía de RMN. Se determinó que los aceites vegetales fueron los mejores sustratos para el crecimiento de las bacterias y producción de los biosurfactantes de tipo glicolípido, que formaron rápidamente emulsiones acuosas de petróleo pesado, disminuyeron la tensión superficial entre 28,51 y 30,5 dinas cm⁻¹ y formaron emulsiones estables de parafina líquida en agua, durante varios meses, a temperatura ambiente (Sulbarán *et al.*, 2005).

El uso de surfactantes que solubilizan fracciones de hidrocarburos contaminantes, representa una alternativa para cualquier proceso de remediación. Se investigó la actividad emulsificante de un biosurfactante de naturaleza ramnolípida producido por *Pseudomonas aeruginosa* PB25 cultivada en glicerol como única fuente de carbono. Se determinó una velocidad de crecimiento específica (μ) de 0,0351 h⁻¹, un tiempo generacional (t_g) de 19,75 h, una concentración máxima de 0,13 g de ramnolípido por gramo de

glicerol y $0,082 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ de productividad. Asimismo, se alcanzó un máximo de actividad emulsificante de $5,257 \text{ UAE mL}^{-1}$ frente a crudo de petróleo e índices de emulsificación E_{24} de 53, 64, 62 y 84% para crudo de petróleo, petróleo diésel 2, gasolina y kerosene, respectivamente. Se concluyó que el surfactante puede ser utilizado en remediación de ambientes contaminados con petróleo (Giraldo, 2012).

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 hidrocarburo de tres pozos. Se obtuvieron cinco consorcios de bacterias capaces de crecer a 30, 40 y 60 °C utilizando glicerol, keroseno y melaza como fuentes de carbono, obteniéndose la máxima producción de biosurfactante a 40 °C. Se aislaron siete colonias identificándose fenotípica y molecularmente *Pseudomonas aeruginosa*. El biosurfactante producido por estas bacterias redujo significativamente la tensión superficial del medio de cultivo, de 60 a 40 mN/m, con una concentración micelar crítica de $1112,5 \text{ mgL}^{-1}$. La producción del biosurfactante purificado fue de $26 \text{ mg de ramnolípidos L}^{-1}$, termoestable a 50-121 °C durante 1 hora. Se concluyó que las bacterias pueden ser aplicadas en técnicas de MEOR en yacimientos maduros (Mondragón, 2011).

En la zona de hundimiento del petróleo Prestige, a 4000 m de profundidad, se colectaron muestras de agua y sedimentos marinos, aislándose 113 bacterias, entre las que se seleccionaron 18 productoras de exopolisacáridos con actividad emulgente. La caracterización fisiológica y molecular identificó *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Halomonas*, *Thalassospira*, *Pseudomonas* y *Pseudoaltermonas*. La producción de bioemulgentes alcanzó 1 gL^{-1} con *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *Brevibacterium casei*, *Halomonas alkantarctica*, *H. variabilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *P. grimontii*, alcanzándose 25% de emulsión frente a siete sustancias hidrófobas. Con base al índice de calidad bioemulgente se determinó que las mejores características correspondieron al polímero de *Halomonas* spp. considerándose promisorio como herramienta biotecnológica (Uad, 2012).

El efecto de los biosurfactantes se investigó en la eficiencia de los procesos de recuperación de aguas contaminadas con crudo liviano. Se

seleccionaron seis cepas de bacterias y se cultivaron en medio mínimo mineral y gasoil como fuente de carbono. Las bacterias MI9 y MI10, cuyo sobrenadante obtenido a las 144 horas fue más eficiente en la disminución de la tensión interfacial de una mezcla de gasoil-agua, fueron escogidas para la producción del surfactante, durante 192 horas. Los tratamientos aplicados fueron: agua de lago, hidrocarburo, cultivo mixto de bacterias y biosurfactante (ANHCB), agua de lago esterilizada, hidrocarburo y cultivo mixto (AEHC), agua de lago, hidrocarburo y cultivo mixto (ANHC), agua de lago, hidrocarburo y biosurfactante (ANHB) y agua de lago e hidrocarburo (ANH). Con ANHCB se alcanzó 81% de remoción de los hidrocarburos, concluyéndose que el uso de biosurfactantes incrementa la eficiencia en la biorremediación de aguas contaminadas con petróleo (Araujo *et al.*, 2008).

2.2 Base teórica

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) provocando descenso de la tensión superficial e interfacial del medio. En su estructura química presentan dos regiones: fracción hidrofílica o cabeza polar, con fuerte afinidad por disolventes polares, sobre todo agua y fracción hidrofóbica o cola apolar, con mayor afinidad por disolventes orgánicos o apolares (Burgos *et al.*, 2011; Giraldo, 2012). En soluciones acuosas, los surfactantes forman agregados de moléculas denominadas micelas, donde la parte hidrofóbica del surfactante se oculta del entorno acuoso, mientras que la parte hidrofílica queda expuesta a la fase acuosa. La formación de micelas en soluciones acuosas favorece la tendencia de las cadenas alquílicas para evitar el contacto desfavorable con el agua y la capacidad de la parte polar para mantener contacto con el ambiente acuoso (Mondragón, 2011).

Las propiedades más interesantes de los surfactantes están asociadas a su carácter anfipático, el cual les confiere la capacidad de reducir la tensión superficial e interfacial de dos fases y formar microemulsiones de dos compuestos inmiscibles, donde los compuestos hidrofóbicos pueden solubilizarse con el agua o el agua puede solubilizarse en compuestos hidrofóbicos. Por estas características son excelentes detergentes,

emulsionantes, espumantes y dispersantes (Mondragón, 2011). Estas propiedades son caracterizadas por los parámetros: concentración micelar crítica (CMC), capacidad emulsionante, balance hidrofílico-hidrofóbico (HLB) y formación de cristales líquidos (Burgos, 2012; Riojas *et al.*, 2010) o CMC, número de agregación (n_a), HLB y punto de nube, PN (Jiménez *et al.*, 2010).

La efectividad de todo surfactante, está determinada por la reducción de la tensión superficial. Ésta es una medida de la energía libre de la superficie por unidad de área. Un buen surfactante puede reducir la tensión superficial del agua de 72 a 35 mN/m y la tensión interfacial (tensión entre líquidos polares y no polares) para el agua contra el n-hexadecano de 40 a 1 mN/m (Muthusamy *et al.*, 2008). La concentración de los surfactantes en la que se alcanza la mínima tensión superficial es denominada CMC o concentración de surfactantes por debajo de la cual, las micelas se forman espontáneamente (Jiménez *et al.*, 2010).

La tensión superficial puede correlacionarse proporcionalmente con la concentración del surfactante en el medio, hasta que la CMC es alcanzada. Los buenos surfactantes para la industria son aquellos que tienen una baja CMC y por lo tanto se requiere una menor cantidad de surfactante para reducir la tensión superficial. De este modo, la CMC es la mínima concentración necesaria para la iniciación de la formación de micelas. En la práctica, la CMC es la máxima concentración permitida de los monómeros del surfactante en agua y es influenciada por el pH, temperatura y fuerza iónica del medio (Giraldo, 2012).

El n_a indica el promedio de moléculas de surfactante que se encuentran formando las micelas. Los agregados micelares están conformados generalmente de 20-100 monómeros, con un radio aproximado de 1,5-30 Å. El HLB es un valor que representa la capacidad de un surfactante para formar emulsiones estables en sistemas agua-aceite o aceite-agua, al compararse con valores estándar establecidos de HLB para los surfactantes ácido oleico (HLB = 1) y oleato de sodio (HLB = 20). Valores cercanos a 1 indican que el surfactante forma emulsiones estables en sistemas agua-aceite, mientras que valores de HLB cercanos a 20 señalan su capacidad para formar emulsiones

estables en sistemas aceite-agua. El oleil-soforolípido con un HLB de 7-8 es un excelente agente humectante (Jiménez *et al.*, 2010).

El efecto punto de nube (PN) se define como la temperatura a la cual el surfactante, generalmente no iónico, pierde su solubilidad en una solución acuosa, la cual a nivel macroscópico presenta una apariencia turbia, es decir, en forma de nube. Al incrementarse la temperatura, la solubilidad de los surfactantes decrece gradualmente y las moléculas no solubles rompen el equilibrio existente entre las del surfactante y las del agua, formando superagregados de surfactante, lo cual provoca un cambio de fase y genera turbidez (Kim *et al.*, 2006).

Los parámetros CMC, n_a , HLB y PN caracterizan a los surfactantes que se utilizan en la industria y el ambiente, por su capacidad para solubilizar compuestos poco solubles, formar emulsiones entre fases inmiscibles, humectar superficies hidrófobas y determinar la temperatura a la cual se da un cambio en las propiedades del surfactante. Los surfactantes sintetizados por vía química, según su estructura hidrofílica o grupo polar pueden subclasificarse en iónicos y no iónicos. Los iónicos presentan en su estructura hidrofílica grupos funcionales con cargas eléctricas negativas (aniónicos) o positivos (catiónicos), mientras que los no iónicos no presentan carga (Jiménez *et al.*, 2010). También son clasificados en catiónicos, aniónicos, no iónicos y zwitteriónicos y son caracterizados por su balance hidrofílico-lipofílico (HLB). Los compuestos solubles en agua presentan un alto HLB y los compuestos solubles en aceite un bajo HLB (Mondragón, 2011).

Los surfactantes aniónicos presentan carga negativa en el grupo polar. Son moléculas con cationes orgánicos e inorgánicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+) y en su parte hidrofílica contienen los grupos aniónicos ($-\text{COO}^-$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{O}-\text{PO}_3^{2-}$) unidos a la fracción orgánica. La mayoría son alquil-carboxilatos o jabones, sulfonatos o detergentes en polvo y sulfatos o agentes espumantes. Los tensioactivos catiónicos presentan carga positiva en el grupo polar. En su mayoría están constituidos por sales de amonio cuaternario o bien sales de alquilaminas, con propiedades antiestáticas, suavizantes y desinfectantes. Los tensioactivos anfóteros tienen grupos aniónicos y catiónicos, como los aminoácidos, betaínas y fosfolípidos. Son

estables en sistemas ácidos y alcalinos y se les usa en productos cosméticos. Los tensioactivos no iónicos tienen grupos hidrofílicos del tipo alcohol, fenol, éter o amida y no se ionizan en solución acuosa, por ejemplo el Tween y Span o ésteres de sorbitán etoxilados y no etoxilados, respectivamente. (Mondragón, 2011; Burgos, 2012).

2.2.1 Biosurfactantes

Los biosurfactantes (BS) son moléculas anfipáticas producidas por bacterias, hongos y levaduras. La parte hidrofílica consiste generalmente de alguna de las estructuras siguientes: aminoácidos, péptidos aniónicos o catiónicos y carbohidratos; la parte hidrofóbica está constituida por ácidos grasos saturados o insaturados (Jiménez *et al.*, 2010). Pueden ser de bajo y alto peso molecular. Los BS de bajo peso molecular son generalmente glicolípidos, lipopéptidos, aminoácidos modificados y ácidos grasos y son más efectivos para disminuir la tensión superficial e interfacial del medio. Los BS de alto peso molecular son polisacáridos, proteínas, lipoproteínas o una mezcla compleja y son más efectivos como estabilizantes de emulsiones aceite con agua (Raiger & López, 2009; Riojas *et al.*, 2010; Burgos, 2012).

A diferencia de los surfactantes químicos, los BS son clasificados por la composición química del grupo polar. Los más estudiados son los glicolípidos, lipopéptidos, ácidos grasos, fosfolípidos, surfactantes poliméricos y surfactantes particulados. Los glicolípidos son los más conocidos. Son carbohidratos unidos a una larga cadena de ácidos grasos o hidroxácidos grasos, mediante enlaces éter o grupos éster. Están formados por mono, di, tri y tetrasacáridos en combinación con una o más cadenas de ácidos alifáticos o ácidos hidroxialifáticos. Pueden subclasificarse en ramnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos. Entre los lipopéptidos destacan la gramicidina S, polimixina y surfactina, los dos primeros con actividad antibacteriana. Por su parte, los biosurfactantes poliméricos están constituidos por diversos grupos químicos, destacando el emulsán y liposán. Los biosurfactantes particulados son vesículas celulares microbianas con actividad surfactante como *Serratia* y las cianobacterias (Jiménez *et al.*, 2010).

La mayoría de bacterias, levaduras y mohos poseen un metabolismo capaz de producir biosurfactantes; no obstante, estos compuestos mayoritariamente son producidos por *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia rubidea* (ramnolípidos), *Rhodococcus erythropolis*, *Mycobacterium* spp., *Arthrobacter* spp., *Nocardia* spp. (trehalolípidos), *Torulopsis bombicola*, *Candida apicola* (soforolípidos), *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Lactobacillus* spp., *B. brevis*, *B. polymyxa* (lipopéptidos), *Acinetobacter calcoaceticus* (emulsán) y *Candida lipolytica* (liposán), entre otros (Jiménez *et al.*, 2010; Riojas *et al.*, 2010; Burgos, 2012).

Los microorganismos utilizan una amplia variedad de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía para su crecimiento. Cuando estos sustratos son inaccesibles por su baja solubilidad, competencia con otros microorganismos u otro tipo de factor ambiental, utilizan a los biosurfactantes para disponer de la fuente de carbono. Las principales funciones de los biosurfactantes a nivel fisiológico son: emulsificación y solubilización de compuestos insolubles en fases acuosas facilitando su disponibilidad para el crecimiento y mantenimiento; adherencia y liberación de células en superficies; actividad antibiótica y mejora del transporte de hidrocarburos a nivel de la membrana celular. Por su parte, los biosurfactantes tienen una aplicación potencial en el sector ambiental y de recuperación de crudo, así como en el área agrícola, farmacéutica, de alimentos y cosméticos (Jiménez *et al.*, 2010; Burgos, 2012).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material

Suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, bacterias degradadoras de petróleo y semillas de *Raphanus sativus* L. “rabanito”.

3.2 Población y muestra de estudio

La población estuvo constituida por el suelo contaminado con petróleo en el lote III de la empresa Interoil Perú S.A. en la provincia de Talara, región Piura y se investigaron 52 muestras, colectadas en agosto de 2014. El número de muestra fue calculado según la fórmula mencionada por Vásquez *et al.* (2012), tomando en cuenta un estudio piloto realizado por los investigadores, en el que se determinó una prevalencia de 90% (Anexo 1).

3.3 Métodos

3.3.1 Variable en estudio

Variable cuantitativa: Rendimiento de surfactantes.

3.3.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación descriptivo se ejecutó en dos fases contrastándose la hipótesis, con el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt (1986), mencionado por Vásquez *et al.* (2012). En la primera fase se determinaron las características del suelo contaminado, se aislaron bacterias heterótrofas, se caracterizaron las degradadoras de hidrocarburos de petróleo y se seleccionaron las productoras de biosurfactantes. En la segunda fase se determinó el rendimiento de surfactantes producidos.

3.3.3 Primera fase: Aislamiento y selección de bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo

a) Lugar de muestreo

Para el aislamiento de bacterias degradadoras de petróleo se tomaron muestras de suelo contaminado en la provincia de Talara, región Piura (Figura 1), registrándose la posición de los puntos de muestreo (Tabla 1), con un GPS GARMIN eTrex Vista HCx. Talara se encuentra al noroeste de la ciudad de Piura y está comprendido entre los paralelos 4°35'00" de latitud sur y 1°16'00" de latitud oeste. La zona presenta un clima desértico subtropical árido, con una temperatura máxima de 32 °C durante enero a marzo y una mínima de 18 °C en invierno, con un promedio anual de 21 °C (Municipalidad Provincial de Talara, 2014).

b) Obtención de muestras de suelo

Las muestras de 1 kg de suelo contaminado con petróleo, se colectaron y depositaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas (Figura 2), e inmediatamente se transportaron en un envase térmico ($10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, en Lambayeque.

c) Análisis químico y microbiológico de suelo contaminado

En el laboratorio se tomaron submuestras de 50 g de cada muestra, obteniéndose una muestra compuesta de 2600 g, con la que se realizó el análisis químico y microbiológico y se determinó la toxicidad de los contaminantes del suelo.

La obtención de submuestras se realizó según el método de “cuarteo y amontonamiento” (Ayasta & Bernable, 2012). Las muestras de suelo se depositaron en un papel bond, para separar las piedras y disgregar las partículas gruesas. El volumen del suelo 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 (Figura 3).

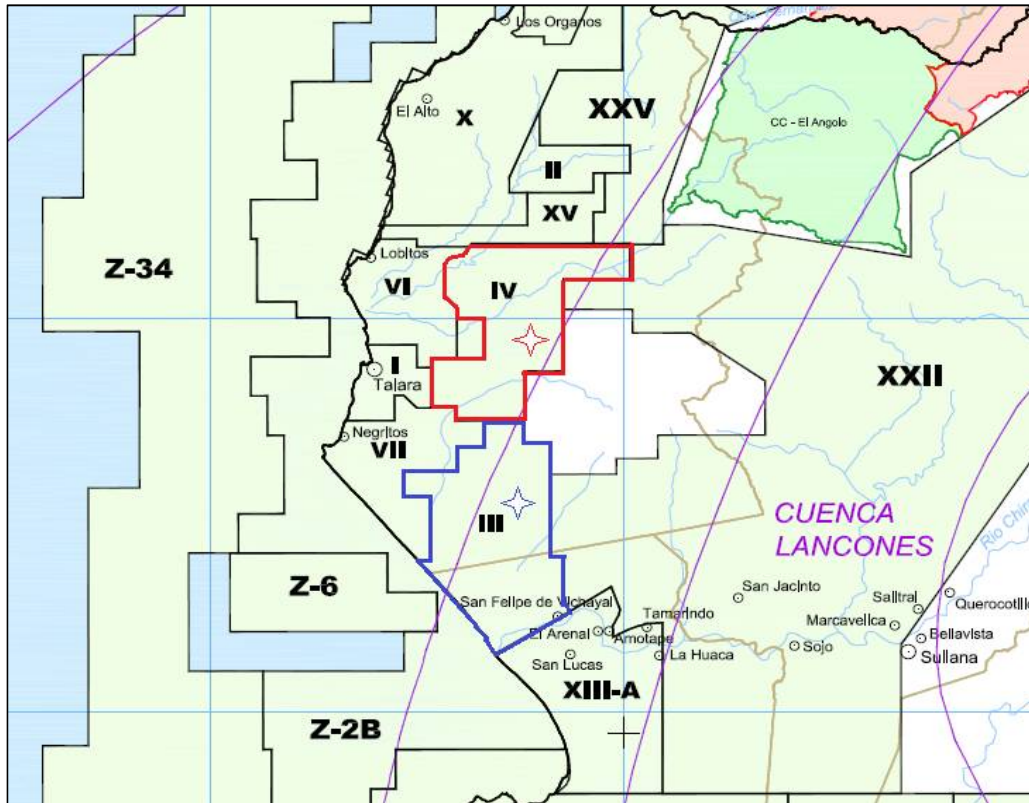


Figura 1. Ubicación del lugar de muestreo correspondiente a los lotes III y IV de la Empresa Interoil Perú S.A. en la provincia de Tarma, región Piura (<http://www.perupetro.com.pe/wps/wcm/connect/d9f1197d-390f4315-a976-b8adfb02133/ONO+Nov+2014.pdf?MOD=AJPERES>)

Tabla 1. Posición de los puntos de muestro de los suelos contaminados con petróleo crudo en el lote III de la empresa Interoil Perú S. A. en Piura, 2014

Punto	Posición	Punto	Posición	Punto	Posición
1	0484481 9467631	19	0484489 9467688	37	0484522 9467640
2	0484475 9467638	20	0484493 9467689	38	0484495 9467640
3	0484473 9467641	21	0484495 9467692	39	0484493 9467693
4	0484470 9467695	22	0484501 9467690	40	0484492 9467641
5	0484467 9467678	23	0484501 9467693	41	0484493 9467643
6	0484466 9467654	24	0484504 9467695	42	0484493 9467642
7	0484461 9467660	25	0484510 9467693	43	0484493 9467648
8	0484466 9467660	26	0484507 9467689	44	0484494 9467642
9	0484464 9467664	27	0484411 9467698	45	0484494 9467642
10	0484467 9467669	28	0484712 9467680	46	0484473 9467642
11	0484498 9467631	29	0484517 9467676	47	0484494 9467642
12	0484472 9467673	30	0484517 9467671	48	0484494 9467643
13	0484473 9467676	31	0484523 9467666	49	0484494 9467642
14	0484473 9467648	32	0484525 9467658	50	0484499 9467633
15	0484477 9467680	33	0484521 9467651	51	0484500 9467634
16	0484481 9467684	34	0484526 9467645	52	0484501 9467633
17	0484495 9467638	35	0484500 9467632		
18	0484487 9467664	36	0484523 9467636		



Figura 2. Muestras de suelo contaminado con petróleo crudo.



Figura 3. Técnica del cuarteo y amontonamiento de muestra de suelo contaminado.

En el submuestreo, se formó un “montón” con el suelo en cada cambio de posición y una vez homogenizadas las muestras se tomaron las submuestras requeridas. El análisis químico del suelo contaminado se realizó en una submuestra de 1 kg, determinándose la cantidad de hidrocarburos totales (HTP) en el laboratorio de la empresa Quimpetrol Perú, EIRL, en Piura, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), utilizando un cromatógrafo de gases modelo 6890N (Net Work GC system) y un espectrómetro de masas modelo 5975 inert XL (Agilent Technologies).

Para el análisis microbiológico, se tomaron por triplicado submuestras de 10 g y se determinó el número de microorganismos totales y degradadores de hidrocarburos o hidrocarbonoclasticos, mediante la técnica del número más probable (Viñas, 2005; Llanos, 2011). Las submuestras de suelo se depositaron en frascos con 90 mL de solución salina, NaCl 0,85%, (p/v), obteniéndose suspensiones, con las que se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-7} .

Para determinar el número más probable de microorganismos totales, 1 mL de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} se inoculó por triplicado en tubos de 150 x 20 mm conteniendo 5 mL de caldo nutritivo (Anexo 2), incubándose a 30 °C hasta por 10 días. Para determinar el número más probable de microorganismos 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 Hass e inmediatamente después en cada tubo se vertieron 0,025 mL (25µL) de petróleo crudo liviano como fuente de carbono. Los tubos se incubaron a 30 °C hasta por 10 días y se consideró como positivo a la presencia de microorganismos totales e hidrocarbonoclasticos la turbidez del medio de cultivo, realizándose el cálculo correspondiente (Anexo 3), según el método estándar (Huapaya, 2011).

d) Toxicidad de contaminantes de suelo

La toxicidad de los contaminantes de la muestra de suelo investigado, se determinó por triplicado en submuestras de 10 g (Salas & Meza, 2011). Se utilizaron semillas de rabanito, a las que previamente se les determinó el porcentaje de germinación. En cinco placas de Petri, con papel esterilizado y humedecido con agua destilada esterilizada se depositaron 20 semillas por placa, se taparon y se mantuvieron a temperatura ambiente (28 °C), humedeciéndolas interdiariamente, hasta obtener el máximo de germinación, que fue 99% después de 120 horas.

En tres frascos de vidrio de 250 mL de capacidad conteniendo 90 mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85% p/v), se depositaron 10 g de suelo y se homogenizaron durante 20 minutos, obteniéndose suspensiones del suelo contaminado. En simultáneo, en doce placas de Petri, se depositaron 10 g del suelo correspondiente, se vertieron 12 mL del sobrenadante de la suspensión previamente obtenida y con una pinza se depositaron 25 semillas en cada placa. Éstas se cubrieron con papel bond durante 120 horas, a 28 °C y después de 48 horas, se vertieron 3 mL adicionales del sobrenadante, para mantener la humedad requerida.

A las 120 horas se contaron las semillas germinadas y se midió la longitud de las radículas emergidas. El porcentaje de germinación relativo (PGR), crecimiento relativo de la radícula (CRR) e índice de germinación (IG) fueron calculados (Llanos, 2011) según las siguientes fórmulas:

$$PGR = \frac{\text{Número de semillas germinadas en el suelo contaminado} \times 100}{\text{Número de semillas germinadas en el control positivo}}$$

$$CRR = \frac{\text{Longitud promedio de radículas en el suelo contaminado} \times 100}{\text{Longitud promedio de radículas en el control positivo}}$$

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

Donde:

PGR = Porcentaje de germinación

CRR = Crecimiento relativo de radícula

IG = Índice de germinación

La fitotoxicidad se determinó con el criterio de interpretación utilizado por 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 una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas, criterios correspondientes a niveles de fitotoxicidad bajo, moderado y severo, respectivamente.

e) Aislamiento de bacterias heterótrofas cultivables

Las bacterias heterótrofas cultivables de las muestras de suelo contaminado se enriquecieron, depositando 10 g de cada una en 90 mL de caldo Bushnell Hass más 5 mL (5%) de petróleo crudo. Después de la incubación a 30 °C, durante 7 días, con agitación diaria durante 10 minutos, se tomaron por triplicado alícuotas de 0,1 mL y se sembraron mediante la técnica de agotamiento y estría en agar nutritivo y Mac Conkey (Figura 4) y se incubaron a 30 °C, durante 24 horas (Galindo & Llontop, 2015).

Las colonias desarrolladas en el agar nutritivo se agruparon según sus características morfológicas y se seleccionó una representante de cada morfotipo. En el agar Mac Conkey se seleccionaron las colonias de bacterias no fermentadoras de lactosa. Con todas las bacterias aisladas se realizaron tinciones de Gram y se cultivaron en agar Tripticasa Soya (TSA) y Bushnell Hass con 5% de petróleo crudo, constituyendo los cultivos puros (Figura 5), que se guardaron en refrigeración a 8 °C.

f) Caracterización de bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo

Las bacterias heterótrofas aisladas de suelo contaminado con petróleo se investigaron, considerándose degradadoras aquellas que utilizaron el petróleo como fuente de carbono y energía (Galindo & Llontop, 2015).

En la determinación del tiempo requerido para la utilización de petróleo como fuente de carbono y energía, cada bacteria cultivada en agar Bushnell Hass con petróleo, fue inoculada por triplicado en 5 mL de caldo Bushnell Hass con indicador púrpura de bromocresol.

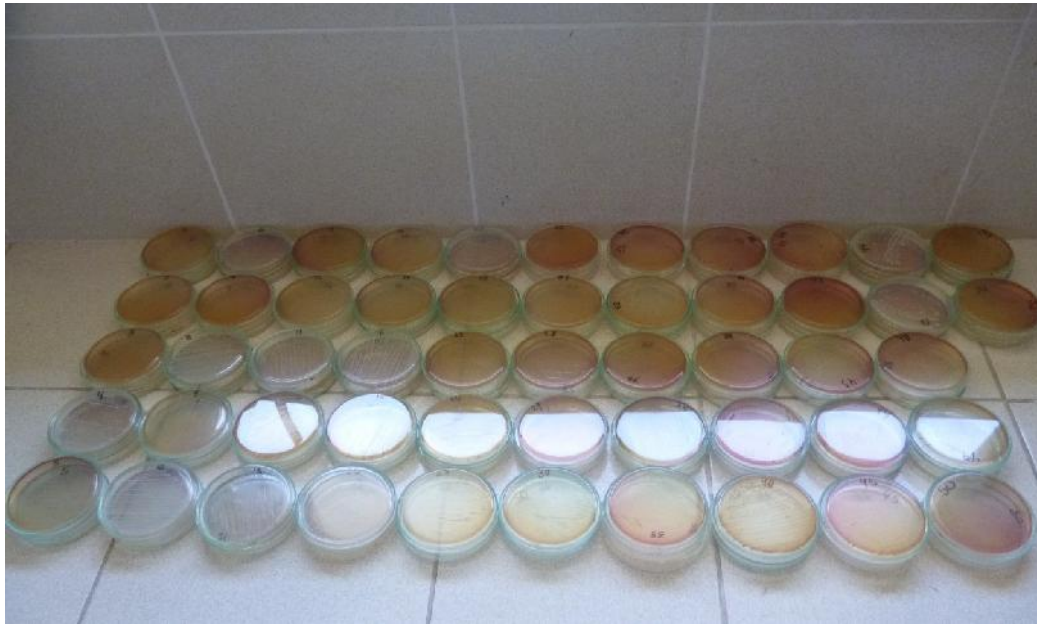


Figura 4. Bacterias heterótrofas desarrolladas en agar nutritivo y agar Mac Conkey.



Figura 5. Cultivos de bacterias heterótrofas aisladas de suelo contaminado con petróleo.

En cada tubo inoculado con las bacterias se agregó 1% (0,05 mL ó 50 µL) de petróleo crudo, incluyéndose tres tubos con caldo de cultivo no inoculado como testigo. La incubación se realizó a 30 °C, hasta por 240 horas con agitación manual, diaria por 10 minutos y en simultáneo se investigó el viraje del indicador del lila al amarillo (Figuras 6,7), que se interpretó como positivo para la utilización del petróleo como fuente de carbono y energía. Cuando se observó crecimiento bacteriano, pero no viraje del indicador se consideró un tiempo mayor de 24 horas.

g) Caracterización morfológica de bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo

Las bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo se cultivaron en agar Mac Conkey a 30 °C, durante 48 horas. Las colonias desarrolladas se agruparon en fermentadoras y no fermentadoras de lactosa y a las células se les realizó tinción de Gram para determinar la reacción, morfología y disposición de las células (Galindo & Llontop, 2015).

3.3.4 Segunda fase: Rendimiento de surfactantes producidos por las bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo

La selección de bacterias productoras de surfactantes se realizó mediante la prueba de dispersión de gota (Sulbarán *et al.*, 2005; Mondragón., 2011) observándose un halo de emulsión sobre una capa de hidrocarburo. La cantidad de biosurfactante producido es directamente proporcional al diámetro del halo de emulsión.

a) Prueba de dispersión de gota

Las bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo se cultivaron (Anexo 4), por triplicado en 1 mL de medio mínimo salino de Davis con 1% v/v de glicerol (Sulbarán *et al.*, 2005) y medio A con 1% de glucosa (Mondragón., 2011). La incubación se realizó a 30 °C, durante 24 horas, con agitación manual (5´) cada 4 horas, obteniéndose el inóculo bacteriano. Éste fue inoculado por triplicado en 5 mL de los mismos medios, incubándolos a 30 °C, durante 3 días, con agitación manual (5´) cada 12 horas (Figura 8).



Figura 6. Caldo Bushnell Hass, inoculado con bacterias heterótrofas aisladas de suelo contaminado con petróleo.

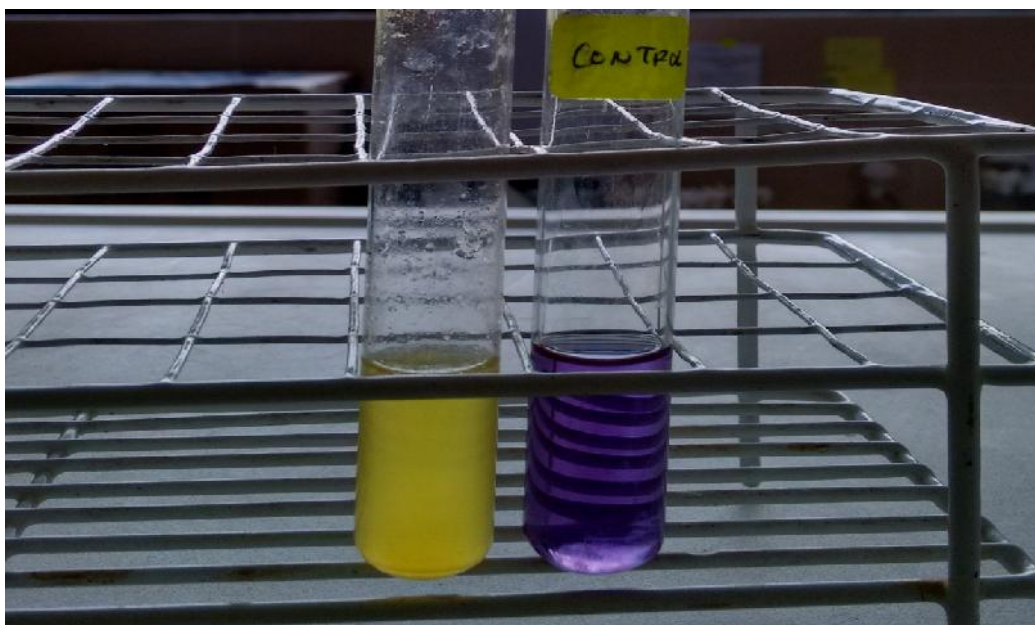


Figura 7. Viraje del indicador púrpura de bromocresol al amarillo en caldo Bushnell Hass.

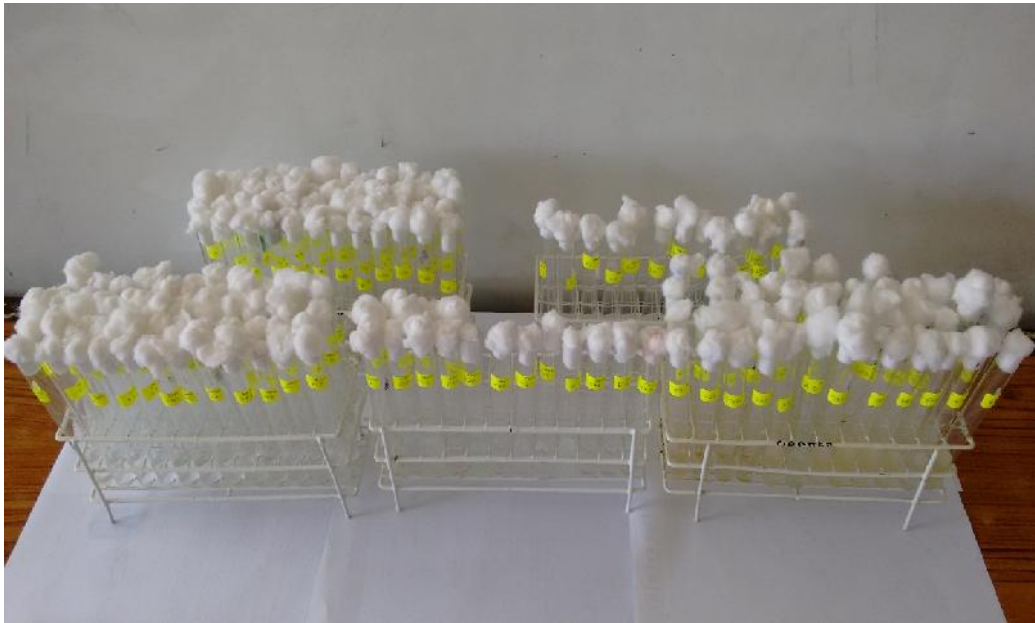


Figura 8. Medios cultivados con bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo.

Los medios cultivados se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes se utilizaron para la prueba de dispersión de gota. Círculos de papel milimetrado de 9,2 cm de diámetro se colocaron debajo de placas de Petri conteniendo 10 mL de agua destilada (Figura 9) y sobre ellas se depositaron cuidadosamente y en toda la superficie, 0,5 mL de petróleo crudo liviano, tratando de formar una capa homogénea (Figura 10). También se acondicionaron jeringas de 1 mL a las que se les adaptaron “tips” (Figura 11) previamente esterilizados (121 °C por 15 minutos en autoclave), con las que se tomaron gotas (\bar{x} 10 μ L por gota) del sobrenadante y aproximadamente a una altura de 20 cm se depositaron en 1/3 de la superficie de la placa de Petri previamente acondicionada (Figura 12). Este proceso se repitió tres veces, constituyendo las repeticiones para cada cultivo bacteriano. Inmediatamente después, se midió (mm) el diámetro del halo de dispersión formado (primera medición) y transcurridos 5 minutos se realizó la segunda medición, seleccionándose las diez bacterias con los mayores halos para la determinación del rendimiento.

b) Rendimiento de surfactantes

Las bacterias productoras de surfactantes fueron cultivadas en medio mínimo salino de Davis y después de 4 días se cuantificó la biomasa y el surfactante y se calculó el coeficiente de rendimiento $Y_{p/x}$.

b.1. Proceso productivo

Las bacterias se cultivaron en matraces de 1 L conteniendo 300 mL del medio mínimo salino de Davis con 1% v/v de glicerol como fuente de carbono, incubándose durante 4 días a 30°C \pm 2, con agitación constante manual (5´) cada 12 horas (Sulbarán *et al.*, 2005). Diariamente, se realizó la prueba de dispersión según la metodología descrita en el ítem 3.3.4 a.

b.2. Cuantificación de biomasa por turbidimetria

Para cuantificar la biomasa por turbidimetria a 600 nm (DO_{600}), según Guzmán & Hurtado (2011), inicialmente se obtuvo la curva patrón entre densidad óptica y biomasa seca.

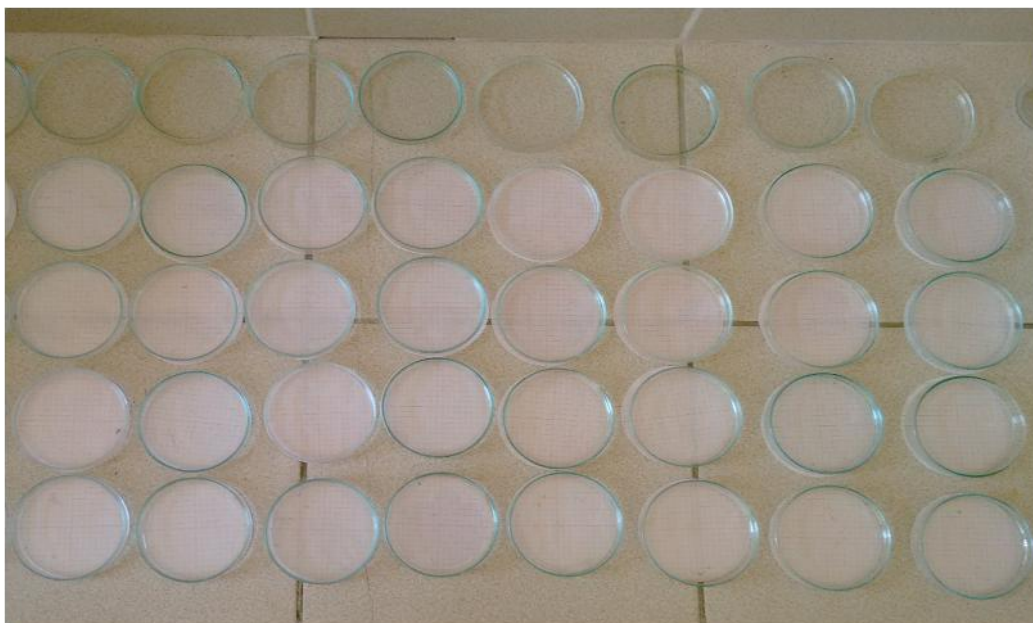


Figura 9. Papel milimetrado debajo de placas de Petri con agua destilada.



Figura 10. Placas de Petri con agua destilada y capa superficial homogénea de petróleo crudo liviano.



Figura 11. Jeringa de 1 mL acondicionada con tip.

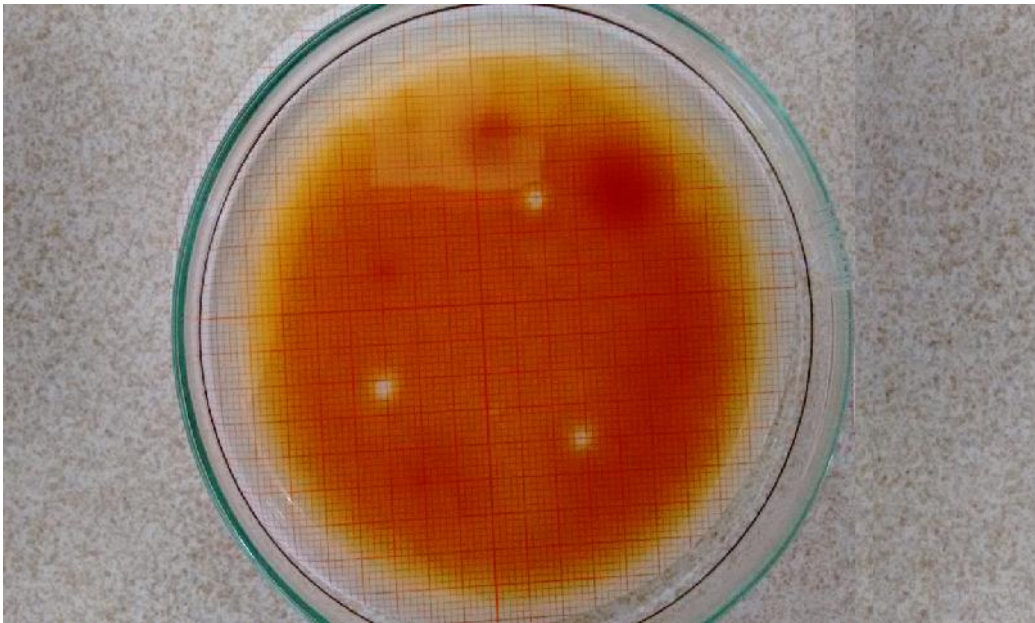


Figura 12. Gotas de sobrenadante de cultivo bacteriano sobre capa superficial de petróleo crudo liviano.

Cada bacteria desarrollada en agar mínimo salino de Davis a 30 °C, por 24 horas, se cultivó en 5 mL de caldo mínimo salino, hasta alcanzar 10^7 cel mL⁻¹ (tubo N° 1 del nefelómetro de MacFarland). Se colectaron submuestras de 4 mL de cada cultivo bacteriano, totalizando 80 mL. A continuación, se tomaron 2 mL, uno para determinar la absorbancia a 560 nm (tubo 1) y otro para realizar diluciones decimales hasta 10^{-3} (tubos 2, 3, 4), a los que también se determinó su absorbancia. Los 78 mL restantes de caldo mínimo salino fueron centrifugados a 3500 rpm, durante 30 minutos.

El sedimento o biomasa fue lavado en solución salina esterilizada, después centrifugado y deshidratado a 42°C, hasta obtener peso constante. La biomasa deshidratada fue pesada y el valor obtenido expresado en gramos por litro (gL⁻¹), correspondiendo a la absorbancia del tubo 1 (Figura 13). Asimismo, el valor de la biomasa se dividió entre 10, 100 y 1000, correspondiendo a la absorbancia de los tubos 2, 3 y 4 (10^{-1} , 10^{-2} , y 10^{-3}). Con los datos se determinó la ecuación de regresión, para calcular la biomasa de cada una de las bacterias productoras de surfactantes.

La concentración de biomasa de cada bacteria fue determinada por espectrofotometría, determinando la densidad óptica de los cultivos a 600 nm. Los valores de biomasa (x) se calcularon en la curva patrón entre densidad óptica y biomasa seca, previamente obtenida.

b.3. Recuperación y cuantificación del biosurfactante

Para la recuperación del surfactante producido (Pérez *et al.*, 2010, Burgos *et al.*, 2011), el cultivo bacteriano de 4 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). El biosurfactante se recuperó en una pera de decantación, en la cual se vertieron inicialmente 100 mL del extracto crudo, añadiéndose inmediatamente 150 mL de acetato de etilo. Se realizaron tres extracciones sucesivas con intervalos de 1 hora (Figura 14). En cada extracción se recuperó el sobrenadante o acetato de etilo conteniendo el biosurfactante y fue depositado en un vaso de precipitación, luego evaporado a 40 °C hasta alcanzar peso constante y finalmente pesado (Figuras 15, 16).



Figura 13. Pesaje de la biomasa de bacterias.



Figura 14. Sobrenadante acidificado del cultivo bacteriano y acetato de etilo en pera de decantación.



Figura 15. Acetato de etilo conteniendo el biosurfactante recuperado después de tres extracciones sucesivas.



Figura 16. Pesaje de biosurfactante recuperado.

b.4. Cálculo del rendimiento

El $Y(p/x)$ o coeficiente de rendimiento de producto en relación a 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 según Dorán (1998).

$$Y_{p/x} = \frac{p - p_0}{x - x_0} = \frac{p}{x}$$

c) Identificación fenotípica del género de las bacterias productoras de surfactantes

Las tres bacterias que presentaron los mayores valores en el rendimiento de surfactantes, se identificaron a nivel de género en función de las características morfológicas y fisiológicas según el Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa (Holt *et al.*, 1994) y Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Brenner *et al.*, 2004). Se determinaron las características morfológicas de las colonias y de las células y se realizaron pruebas de catalasa, oxidasa, descarboxilación de arginina y lisina, hidrólisis de gelatina, úrea y almidón, reducción de nitratos, sensibilidad a polimixina B y penicilina, oxido-fermentación, utilización de citrato, producción de indol y acidez a partir de glucosa, manitol y arabinosa.

d) Análisis de los datos

Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas y figuras que permitieron analizar el rendimiento de surfactantes producidos por tres bacterias degradadoras de petróleo. Se utilizaron los programas Microsoft Office Word y Excel versión 2013.

IV. RESULTADOS

4.1 Características químicas, microbiológicas y toxicidad de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo crudo liviano

Las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo crudo liviano del lote III presentaron un contenido de hidrocarburos totales, HTP de 21 200 mg kg⁻¹ (Tabla 2). El número más probable de microorganismos totales por gramo de suelo contaminado (NMP g⁻¹) fue de 4,6 x 10⁶, población que superó a la hidrocarbonoclástica de 3,5 x 10⁴. En cuanto al nivel de toxicidad, fue severo (Tabla 3) en el índice de germinación de rabanito.

4.2 Bacterias heterótrofas cultivables aisladas de suelo contaminado

Las bacterias heterótrofas cultivables se aislaron del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, siendo positivas al aislamiento en agar nutritivo el 100% (52) de las muestras y en agar Mac Conkey el 96,15 (48). En agar nutritivo se obtuvieron 114 aislados de bacterias heterótrofas y 62 en agar Mac Conkey (Tabla 4), totalizando 176 aislados de bacterias.

4.3 Bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo caracterizadas

El 86,36% (152) de bacterias aisladas, utilizaron el petróleo como fuente de carbono y energía (Figura 17), durante 24 – 96 horas (Tabla 5) por lo que fueron consideradas degradadoras de hidrocarburos de petróleo. El 83,55% (127) de bacterias fueron Gram negativas y el 16,45% (25) Gram positivas (Figura 18). En cuanto a la morfología predominaron los bacilos cortos, seguidos de los cocobacilos, ambos dispuestos aisladamente (Tabla 6, anexo 5).

Tabla 2. Contenido de hidrocarburos totales, HTP y número más probable, NMP, de microorganismos totales e hidrocarbonoclasticos en suelo contaminando con petróleo crudo liviano

Características	Lote III
HTP (mg kg ⁻¹)	21 200
Microorganismos totales (NMP g ⁻¹)	4,6 x 10 ⁶
Microorganismos hidrocarbonoclasticos (NMP g ⁻¹)	3,5 x10 ⁴

Tabla 3. Nivel de toxicidad de suelo contaminado con petróleo crudo liviano determinado en *Raphanus sativus* L.

Características	Lote III
Promedio elongación radicular (mm)	18,00
Porcentaje relativo de germinación (PGR)	66,36
Crecimiento relativo de radícula (CRR)	70,33
Índice de germinación (% IG)	46,67
Nivel de fitotoxicidad	Severo

Tabla 4. Bacterias heterótrofas aisladas en muestras de suelo contaminado con petróleo crudo liviano

Muestra código	Agar nutritivo	Agar Mac Conkey
P50 0484499 9467633	2	2
P32 0484525 9467658	3	2
P33 0484521 9467651	3	2
P54 0484498 9467631	1	1
P37 0484495 9467638	2	1
P29 0484517 9467676	3	2
P53 0484500 9467632	3	2
P52 0484501 9467633	4	1
P31 0484523 9467666	2	1
P51 0484500 9467634	2	1
P36 0484523 9467636	2	1
P37 0484522 9467640	2	1
P38 0484495 9467640	2	2
P15 0484477 9467680	3	1
P30 0484517 9467671	1	1
P48 0484494 9467643	2	1
P41 0484493 9467643	3	1
P49 0484494 9467642	2	2
P28 0484712 9467680	2	1
P27 0484411 9467698	1	1
P42 0484493 9467642	2	1
P40 0484492 9467641	3	2
P45 0484494 9467642	1	1
P10 0484467 9467669	1	1
P20 0484493 9467689	3	2
P46 0484473 9467642	4	1
P1 0484481 9467631	3	2
P34 0484526 9467645	2	1
P47 0484494 9467642	1	1
P13 0484473 9467676	2	1
P43 0484493 9467648	3	2
P44 0484494 9467642	1	1
P24 0484504 9467695	2	1
P26 0484507 9467689	2	1
P9 0484464 9467664	1	1
P3 0484473 9467641	1	1
P14 0484473 9467648	2	1
P6 0484466 9467654	3	1
P18 0484487 9467664	2	1
P21 0484495 9467692	3	2
P12 0484472 9467673	2	1
P25 0484510 9467693	3	1
P2 0484475 9467638	3	2
P23 0484501 9467693	2	1
P19 0484489 9467688	2	1
P16 0484481 9467684	1	1
P7 0484461 9467660	2	2
P4 0484470 9467695	2	1
P22 0484501 9467690	2	0
P39 0484493 9467693	2	0
P5 0484467 9467678	2	0
P8 0484466 9467660	3	0

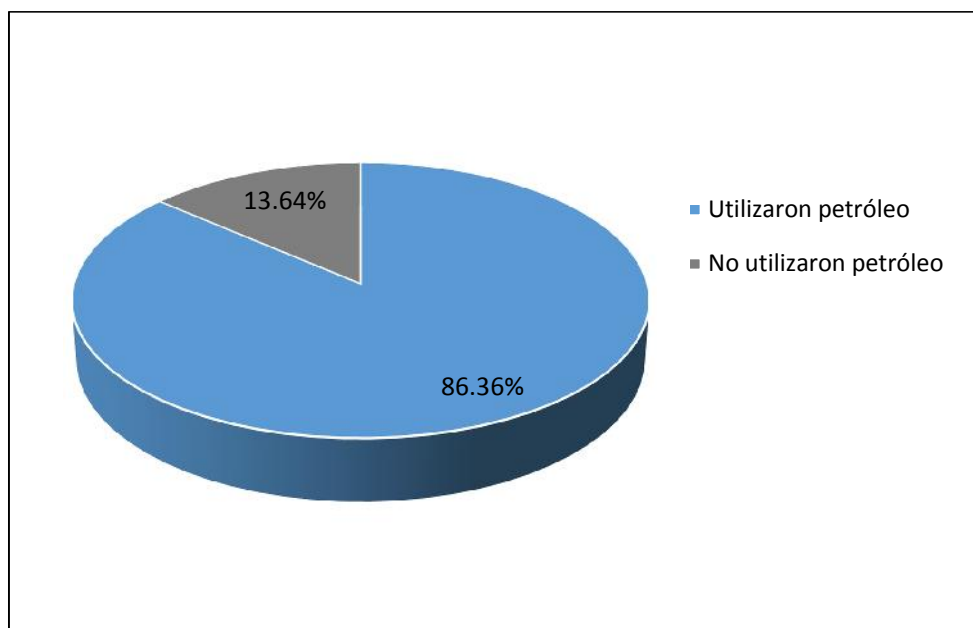


Figura 17. Porcentaje de bacterias de Lote III-Talara, que utilizaron petróleo crudo liviano como fuente de carbono y energía.

Tabla 5. Tiempo requerido para la utilización de petróleo crudo liviano como fuente de carbono y energía por bacterias aisladas de suelo contaminado en Talara

Bacteria código	Tiempo (horas)	Bacteria código	Tiempo (horas)	Bacteria código	Tiempo (horas)
A24	24	10M	72	K4	96
A15	24	F12	72	68M	96
20E	24	F28	72	A80	96
18E	24	23M	72	24M	96
F3	24	F16	72	60M	96
A9	24	A27	72	A34	96
19E	24	A30	72	96M	96
10E	24	A18	72	K49	96
F17	24	21M	72	36E	96
22E	24	F19	72	42E	96
23E	24	F22	72	F21	96
27E	24	42M	72	A46	96
17M	24	F24	72	F13	96
32E	24	F26	72	K9	96
34E	24	37E	72	98M	96
35E	24	38E	72	K12	96
F25	24	40E	72	2M	96
F14	24	41E	72	79M	96
39E	24	F5	72	K44	96
A36	48	21E	72	43E	96
45M	48	81M	72	F29	96
14E	48	A8	72	F2	96
F7	48	19M	72	F4	96
11E	48	F6	72	A86	96
13E	48	K47	96	87M	96
A28	48	55M	96	K8	96
A14	48	K6	96	L9	96
17E	48	A51	96	F8	96
24E	48	25E	96	F10	96
F18	48	A25	96	76M	96
F23	48	A21	96	41M	96
F27	48	12E	96	A64	96
K45	48	64M	96	A29	96
28E	48	A3	96	A93	96
30E	48	A52	96	56M	96
F9	48	K22	96	L49	96
F11	48	26E	96	A47	96
A11	48	29E	96	80M	96
K2	48	A38	96	95M	96
F20	48	62M	96	L24	96
F15	48	A45	96	L52	96
F1	48	A12	96	66M	96
A13	72	61M	96	K50	96
K23	72	A26	96	A81	96
A16	72	A20	96	67M	96
15E	72	31E	96	K13	96
16E	72	A22	96	70M	96
A37	72	L3	96	33E	96
L43	72	A44	96	K40	96
A35	72	A49	96	A31	96
A7	72	18M	96		

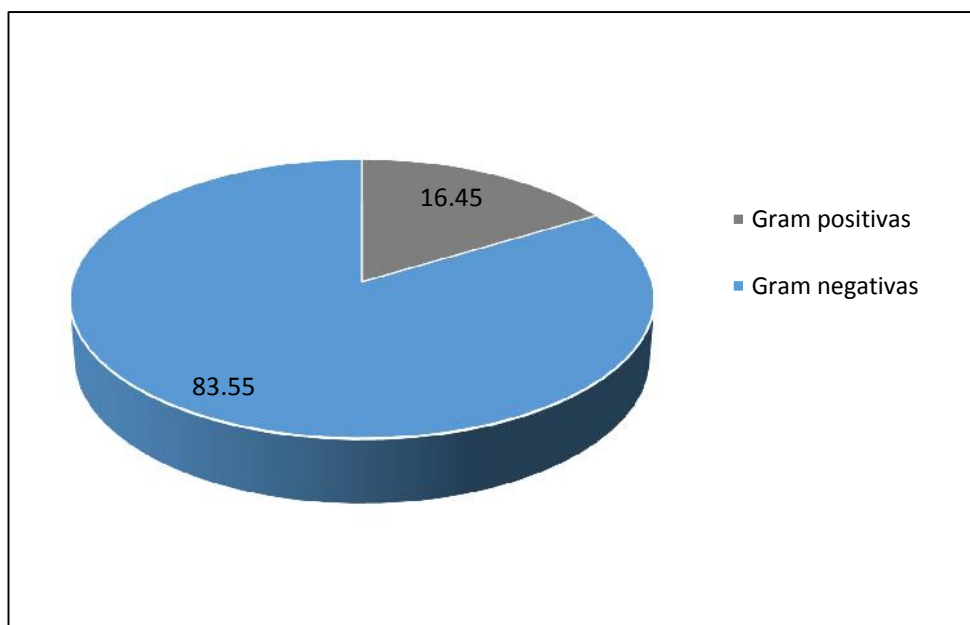


Figura 18. Frecuencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas degradadoras de hidrocarburos de petróleo.

Tabla 6. Frecuencia de bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo según morfología y disposición celular

Cultivos de bacterias		Células	
Nº	%	Morfología	Disposición
94	61,84	Bacilos cortos	Aislados
29	19,08	Cocobacilos	Aislados
9	5,92	Bacilos cortos	Agrupados
5	3,29	Cocos	Racimo
3	1,97	Cocos	Aislados
3	1,97	Cocos	Agrupados
3	1,97	Cocobacilos	Agrupados
2	1,32	Cocos	Cadenas
2	1,32	Bacilos pleomórficos	Aislados
2	1,32	Bacilos pleomórficos	Empalizada

4.4. Bacterias productoras de surfactantes seleccionadas

En el medio mínimo de Davis con glicerol como fuente de carbono, el 95,39% (145) de cultivos de bacterias degradadoras de petróleo desarrollaron con producción de surfactante, evidenciado en la prueba de dispersión en gota en la que se observaron halos de dispersión de petróleo crudo liviano (Figuras 19, 20) cuyos diámetros fueron de 1,66 – 39,66 mm al inicio y 2,0 – 33,0 mm después de 5 minutos (Tabla 7, anexo 6). En el medio A con glucosa como fuente de carbono el 36,84% (56) de bacterias degradadoras desarrollaron con producción de biosurfactante, con halos de dispersión cuyos diámetros fueron de 1,0 – 7,6 mm al inicio y 0 – 7,0 mm después de 5 minutos (Tabla 8, anexo 7).

4.5. Biosurfactante producido y coeficiente de rendimiento de bacterias identificadas

Con los valores de absorbancia obtenidos con diferentes concentraciones de biomasa, se obtuvo la ecuación $y = 0,3175x + 0,0234$ (Tabla 9, figura 21) y debido a que R^2 fue mayor de 0,9 se aceptó como patrón de referencia para el cálculo de la biomasa.

La absorbancia del medio mínimo salino de Davis cultivado con bacterias productoras de surfactantes osciló entre 0,074 a las 24 horas y 0,988 a las 96 horas (Tabla 10), valores correspondientes a concentraciones de 0,159 y 3,038 gL⁻¹, respectivamente (Tabla 11).

El diámetro de los halos de dispersión de petróleo crudo liviano osciló entre 7,67 a 41,0 mm (Tabla 12). Los mayores valores se alcanzaron con los cultivos bacterianos 64M (41 mm), 67M (31 mm) y 55M (26,67 mm), correspondientes a biomasa de 3,007; 2,707 y 3,038 gL⁻¹ y producto biosurfactante de 0,158; 0,142 y 0,092 respectivamente. Una vez identificadas las bacterias (Tabla 13) el coeficiente de rendimiento Y (p/x) fue de 0,053 g L⁻¹ con *Sphingobacterium* sp. 64M; 0,052 gL⁻¹ con *Serratia* sp. 67M y 0,030 gL⁻¹ con *Acinetobacter* sp. 55M (Tabla 14).

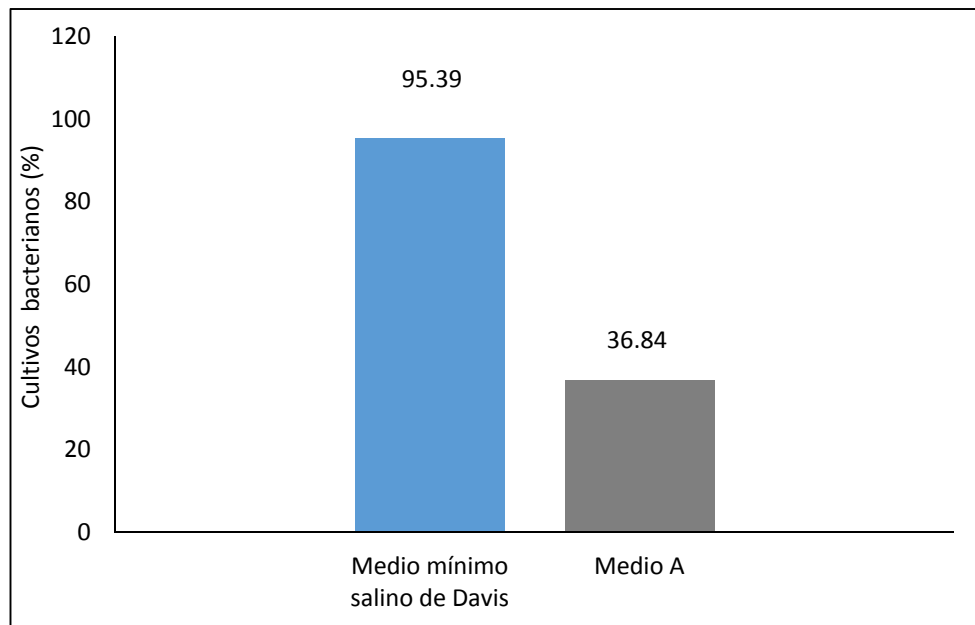


Figura 19. Frecuencia de cultivos bacterianos según crecimiento en medio mínimo salino de Davis y medio A.



Figura 20: Halo de dispersión de petróleo crudo liviano por medio mínimo salino de Davis cultivado con bacterias degradadoras de hidrocarburos.

Tabla 7. Diámetro del halo de dispersión de petróleo crudo liviano por efecto de medio mínimo salino de Davis cultivado con bacterias degradadoras

Promedio de diámetro del halo de dispersión (mm)		Tiempo (minutos)	
		0	5
Cultivos bacterianos Nº	%		
1	0,68	39,66	33,00
1	0,68	37,66	28,33
1	0,68	35,33	28,33
1	0,68	33,66	25,33
1	0,68	33,33	24,33
1	0,68	33,00	24,66
1	0,68	30,66	23,00
1	0,68	24,66	22,00
1	0,68	23,66	19,33
1	0,68	20,00	16,33
1	0,68	20,00	15,33
1	0,68	18,00	18,66
1	0,68	16,33	15,33
3	2,06	15,00	10,66
3	2,06	11,66	7,00
2	1,37	10,33	8,00
3	2,06	9,33	7,66
3	2,06	7,00	6,00
3	2,06	6,66	5,66
3	2,06	6,33	4,33
5	3,44	6,00	5,00
5	3,44	6,00	6,00
3	2,06	5,66	4,33
3	2,06	5,00	3,66
3	2,06	4,66	3,00
4	2,75	4,33	3,33
2	1,37	4,00	4,00
3	2,06	3,66	3,33
1	0,68	3,66	3,00
1	0,68	3,66	3,66
4	2,75	3,33	3,33
1	0,68	3,33	2,33

...continuación

8	5,52	3,00	3,00
4	2,75	3,00	2,66
6	4,14	3,00	2,00
3	2,06	2,66	1,33
4	2,75	2,66	2,33
8	5,52	2,66	2,66
7	4,83	2,33	2,00
5	3,44	2,33	1,33
9	6,21	2,33	2,33
18	12,41	2,00	2,00
3	2,06	2,00	1,00
2	1,37	1,66	2,00
145	100,00		

Tabla 8. Diámetro del halo de dispersión de petróleo crudo liviano por efecto de medio A cultivado con bacterias degradadoras

Promedio de diámetro del halo de dispersión (mm)		Tiempo (minutos)	
		0	5
Cultivos bacterianos			
Nº	%		
1	1,79	7,66	7,00
6	10,71	7,00	6,00
1	1,79	6,66	6,66
1	1,79	6,33	5,66
4	7,14	6,00	6,00
1	1,79	6,00	5,33
1	1,79	5,66	5,66
1	1,79	5,33	4,00
1	1,79	5,00	4,66
1	1,79	4,33	3,00
6	10,71	4,00	4,00
1	1,79	4,00	1,66
3	5,36	3,66	3,66
5	8,93	3,33	3,33
1	1,79	3,33	3,00
1	1,79	3,33	2,00
3	5,36	3,00	3,00
1	1,79	2,33	2,33
8	14,29	2,00	2,00
1	1,79	1,66	1,66
1	1,79	1,66	0,66
5	8,93	1,33	1,33
1	1,79	1,33	1,00
1	1,79	1,00	0,00
56	100,00		

Tabla 9. Valores de absorbancia (600 nm) de biomasa de bacterias productoras de biosurfactantes

Biomasa (g ^L ⁻¹)	Absorbancia (600 nm)
0,31	0,120
0,031	0,052
0,0031	0,022
0,00031	0,009

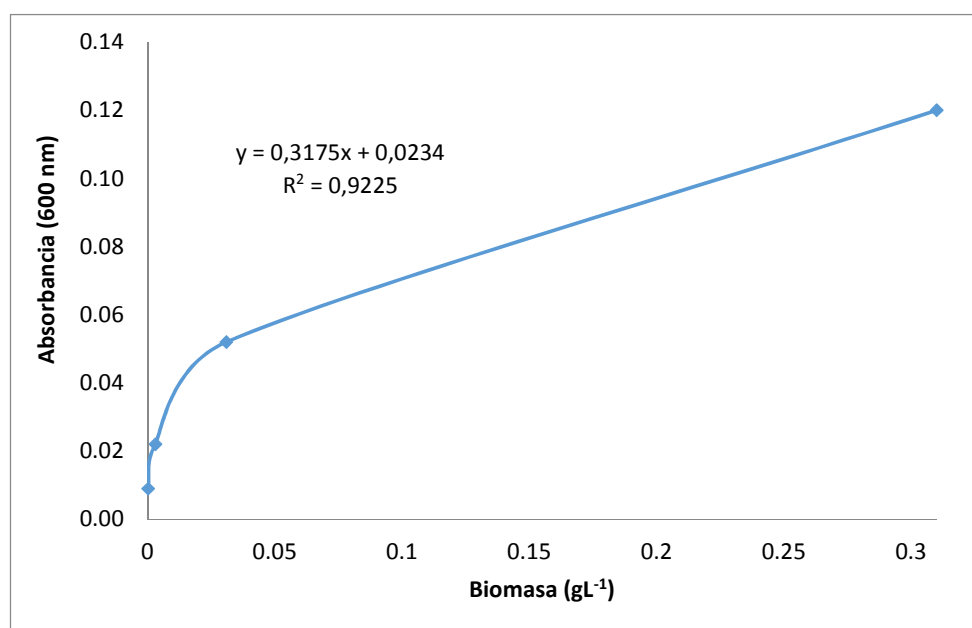


Figura 21. Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de bacterias productoras de surfactantes.

Tabla 10. Absorbancia (600 nm) corregida de biomasa de bacterias productoras de surfactantes en medio mínimo salino de Davis

Código bacteria UNPRG	Absorbancia * 600 nm/horas			
	24	48	72	96
K6	0,167	0,307	0,583	0,759
CH27	0,074	0,077	0,079	0,319
CH51	0,204	0,482	0,600	0,799
55M	0,184	0,721	0,775	0,988
64M	0,282	0,637	0,855	0,978
66M	0,227	0,482	0,634	0,831
67M	0,154	0,406	0,704	0,883
68M	0,127	0,266	0,478	0,605
CH80	0,174	0,254	0,509	0,692
95M	0,157	0,315	0,606	0,727

* Promedio de tres repeticiones

Tabla 11. Concentración (gL⁻¹) de biomasa de bacterias productoras de surfactantes en medio mínimo salino de Davis

Código bacteria UNPRG	Biomasa * (gL ⁻¹)/horas			
	24	48	72	96
K6	0,452	0,893	1,763	2,317
CH27	0,159	0,169	0,175	0,931
CH51	0,569	1,444	1,816	2,443
55M	0,506	2,197	2,367	3,038
64M	0,814	1,933	2,619	3,007
66M	0,641	1,444	1,923	2,544
67M	0,411	1,205	2,144	2,707
68M	0,326	0,764	1,432	1,832
CH80	0,474	0,726	1,529	2,106
95M	0,421	0,918	1,835	2,216

* Promedio de tres repeticiones

Tabla 12. Biomasa y diámetro del halo de dispersión de bacterias productoras de surfactantes

Código bacteria UNPRG	Biomasa (g^L⁻¹)	Diámetro del halo de dispersión* (mm)
64M	3,007	41,00
67M	2,707	31,00
55M	3,038	26,67
CH51	2,443	24,00
K6	2,317	22,33
95M	2,216	21,67
66M	2,544	19,66
CH80	2,106	18,67
68M	1,832	17,33
CH27	0,931	7,67

* Promedio de tres repeticiones

Tabla 13. Características diferenciales de géneros de bacterias productoras de surfactantes seleccionadas

Características	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.	<i>Sphingobacterium</i> sp.
Células	Bacilos rectos	Bacilos rectos	Bacilos rectos
Tinción de Gram	-	-	-
Motilidad	-	+	-
Oxidasa	-	-	+
Catalasa	+	+	+
Descarboxilación de arginina	-	-	-
Hidrólisis de la gelatina	-	+	+
Hidrólisis de la esculina	-	-	+
Reducción de nitratos	-	-	-
Descarboxilación de lisina	+	+	-
Polimixina B (300UI)	No determinado	Resistente	Resistente
Penicilina	Resistente	No Determinado	Resistente
Oxido – fermentación			
• Glucosa	+	+	+
• Maltosa	+	-	+
• Manitol	-	-	-
• Sacarosa	-	+	-
• Xilosa	+	-	-
Utilización de citrato	+	+	+
Producción de indol	-	-	-
Acidez:			
• Glucosa	-	+	+
• Manitol	-	-	-
• Arabinosa	-	-	-
Hidrólisis de urea	-	-	+
Hidrólisis de almidón	-	-	+

Tabla 14. Rendimiento Y (p/x) de surfactantes producidos por bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo

Bacterias	x Biomasa (gL ⁻¹)	p Surfactante* (gL ⁻¹)	Y (p/x)	
			Rendimiento gL ⁻¹	%
<i>Sphingobacterium</i> sp. 64M	3,007	0,158	0,053	5,3
<i>Serratia</i> sp. 67M	2,707	0,142	0,052	5,2
<i>Acinetobacter</i> sp. 55M	3,038	0,092	0,030	3,0

* Promedio de tres repeticiones

V. DISCUSIÓN

El análisis químico del suelo investigado, demostró un contenido de hidrocarburos totales de petróleo, HTP (Total petroleum hydrocarbon, TPH), una población microbiana y toxicidad de los contaminantes, coincidiendo con investigaciones previas de suelos contaminados (Pissani & Cabanillas, 2015; Flores & Benites, 2016). Previo a la implementación de cualquier tecnología de biorremediación se realizan ensayos de tratabilidad o pruebas de laboratorio cuya información aumenta la probabilidad de éxito en el proceso de descontaminación (Prince, 2014).

El HTP fue de 21 200 mg kg⁻¹, valor que incluye aquellos hidrocarburos del extracto orgánico total pertenecientes a las fracciones saturada y aromática (Viñas, 2005) y cuya concentración sirve como indicador del tipo de contaminación de un ambiente (Viñas, 2005; Escorza, 2007; Cando, 2011). La población de microorganismos totales o heterótrofos fue superior a la de hidrocarbonoclasticos o microorganismos que utilizaron el petróleo como fuente de carbono y energía (Viñas, 2005; Acuña *et al.*, 2010; Buendía, 2012). Este resultado junto al contenido de HTP evidenciaron la posibilidad de aislar bacterias degradadoras de hidrocarburos. Los ambientes expuestos a la contaminación prolongada con hidrocarburos de petróleo constituyen un microhábitat adecuado para la evolución de especies microbianas degradadoras o hidrocarbonoclasticas. El contaminante ejerce presión sobre la población microbiana, seleccionándose especímenes capaces de sobrevivir y adaptarse (Gómez *et al.*, 2008).

En las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo se aislaron bacterias heterótrofas cultivables en agar nutritivo y Mac Conkey, por cuanto éstos contienen los nutrientes necesarios para el desarrollo de bacterias que metabolizan sustancias orgánicas como fuente de carbono

(Llanos, 2011). El número de aislados bacterianos fue mayor en agar nutritivo; no obstante, el agar Mac Conkey se prefiere porque es un medio selectivo diferencial en el que desarrollan géneros de bacterias Gram negativas reportadas como eficientes degradadoras de hidrocarburos como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Bacillus* (Llanos, 2011; Pissani & Cabanillas, 2015; Flores & Benites, 2016).

Las bacterias heterótrofas aisladas se consideraron degradadoras de hidrocarburos de petróleo, porque utilizaron el contaminante como fuente de carbono y energía (Chávez, 2010; Llanos, 2011; Galindo & Llontop, 2015). Estos microorganismos oxidan las fracciones del petróleo y les cambian las propiedades, haciéndolos susceptibles de ataques secundarios que los degradan hasta dióxido de carbono y agua (López *et al.*, 2006).

El tiempo mínimo requerido por las bacterias para la utilización del petróleo fue 24 horas coincidiendo con Pérez *et al.* (2010), quienes determinaron que en el periodo de 24-72 horas *Pseudomonas aeruginosa* degradó los hidrocarburos más sencillos n-alcenos de cadenas cortas y posteriormente a las 96-480 horas se degradaron las fracciones más pesadas, isoprenoides, alcanos de cadenas de más de 20 carbonos, cicloalcanos y aromáticos (Pérez *et al.*, 2010; Llanos, 2011). Los bacilos Gram negativos predominaron entre las degradadoras de hidrocarburos de petróleo coincidiendo con Pissani & Cabanillas (2015).

El proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos está condicionado por la estructura química del hidrocarburo, factores ambientales, la fisiología de los microorganismos y los surfactantes producidos. Éstos incrementan la biodisponibilidad de los hidrocarburos mediante la acción paralela de la desorción y solubilización del contaminante, facilitando la transferencia de masa y biodegradación (Riojas *et al.*, 2010). En este contexto, entre las bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo, se investigó la producción de biosurfactantes (Giraldo, 2012), aunque también se han reportado hongos productores (Luna, 2005).

Las bacterias productoras de biosurfactantes se aislaron de suelo contaminado con petróleo coincidiendo con Luna (2005) y

Pérez *et al.* (2010). Los microorganismos productores de biotensioactivos pueden aislarse de diferentes muestras ambientales. En ambientes terrestres o marinos contaminados existe una mayor probabilidad de aislarlas (Luna, 2005; Pérez *et al.*, 2010; Uad, 2012); no obstante, también se pueden aislar de ambientes no contaminados (Burgos, 2012).

La prueba de dispersión de gota permitió seleccionar las bacterias productoras de biosurfactantes. De manera similar Mondragón (2011) seleccionó consorcios bacterianos productores aislados de hidrocarburos provenientes de pozos de campos petroleros. Esta prueba permite detectar microorganismos productores debido a la formación de un halo de emulsión sobre una capa ligera de hidrocarburo y la cantidad de biosurfactante producido es directamente proporcional al diámetro del halo de emulsión formado. En la presente investigación, el diámetro de los halos de dispersión osciló entre 2-33 mm, superando 7-12 mm reportado por Mondragón (2011).

El número de aislados bacterianos que desarrollaron y formaron halos de dispersión de petróleo crudo liviano fue mayor con el glicerol como fuente de carbono en el medio mínimo salido de Davis (Sulbarán *et al.*, 2005) superando a la glucosa del medio A (Mondragón, 2011), coincidiendo con Sulbarán *et al.* (2005). Las fuentes de carbono reportadas para la producción son: glicerol (Sulbarán *et al.*, 2005; Giraldo, 2012), glucosa (Mondragón, 2011), aceite de oliva residual de frituras, aceites de maíz, ajonjolí y de resino (Sulbarán *et al.*, 2005; Burgos, 2012), queroseno (Pérez *et al.*, 2010; Mondragón, 2011), gasoil (Araujo *et al.*, 2008) y melaza (Mondragón, 2011). Con aceites vegetales se han obtenido buenos resultados; no obstante, se prefiere el glicerol porque interfiere menos durante el proceso de extracción y purificación (Sulbarán *et al.*, 2005).

La fuente de carbono utilizada como sustrato, influye en la calidad y cantidad del biosurfactante. Mondragón (2011), manifestó que con sustratos inmiscibles en agua como alcanos y otros hidrocarburos, se producen biosurfactantes; sin embargo, al ser poco económicos, se prefieren fuentes de carbono miscibles en agua como glicerol, glucosa, manitol, etanol y melazas. Este investigador comparó tres medios de cultivo: A (glucosa y glicerol), B (keroseno) y C (melaza y glicerol) incubados a 30, 40 y 60 °C

para la producción de biosurfactantes por consorcios microbianos y determinó que los mayores diámetros en la prueba de dispersión en gota se alcanzaron a 40 °C, con glucosa como fuente de carbono; no obstante, los costos pueden ser disminuidos con la utilización de subproductos de procesos industriales como la melaza.

Las bacterias Gram negativas predominaron entre las productoras de biosurfactantes coincidiendo con Burgos *et al.* (2011) quienes reportaron 54 aislados de bacterias en suelos volcánicos: 57,4% bacilos Gram negativos, 35,2% bacilos Gram positivos, 3,7% cocos Gram positivos y 3,7% levaduras. Los tres aislados bacterianos con la mayor biomasa y diámetro del halo de dispersión se identificaron como *Sphingobacterium*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*; bacterias reportadas previamente por Burgos, 2012 (*Sphingobacterium* sp.), Sulbarán *et al.*, 2005 (*Pseudomonas putida*), Sulbarán *et al.*, 2005; Mondragón, 2011 (*P. aeruginosa*) y Samanez, 2008 (*Acinetobacter* sp.).

La biomasa bacteriana fue de 0,931-3,007 gL⁻¹ y el mayor valor correspondió al mayor diámetro del halo de dispersión (41 mm); no obstante, la relación directamente proporcional no se observó en todas las bacterias. Este resultado puede ser atribuido a que la producción de biosurfactantes está asociada a diferentes fases del crecimiento: exponencial en *Sphingobacterium detergens* (Burgos, 2012); exponencial y estacionaria en *Bacillus* sp. (Nitschke & Pastore, 2006), *B. circulans*, *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* (Rodríguez *et al.*, 2006) y estacionaria en *Pseudomonas aeruginosa* (Santa Anna *et al.*, 2002; Mondragón, 2011).

El mayor rendimiento (0,053 gL⁻¹) de *Sphingobacterium* sp. 64M correspondió a una biomasa de 3,007 gL⁻¹ y biosurfactante de 0,158 gL⁻¹, valores cercanos a 3,8 gL⁻¹ de biomasa y 0,190 gL⁻¹ de biosurfactante reportados por Burgos *et al.* (2011) para *Sphingobacterium detergens* después de 48 horas de cultivo en medio mineral con citrato de sodio como fuente de carbono. En este contexto, *Sphingobacterium* sp. 64M es considerada promisorio por cuanto con la optimización del medio de cultivo es posible incrementar hasta siete veces el rendimiento inicial (Burgos, 2012). La producción de biosurfactantes junto a la capacidad de las bacterias

para degradar hidrocarburos de petróleo las hace potencialmente útiles en procesos de biorremediación y tratamiento de contaminantes (Sulbarán *et al.*, 2005).

VI. CONCLUSIONES

- El suelo contaminado presentó un HTP de 21 200 mg Kg⁻¹, 4,6 x 10⁶ NMP g⁻¹ de microorganismos totales; 3,5 x 10⁴ NMP g⁻¹ de hidrocarbonoclasticas y toxicidad severa en el índice de germinación de rabanito.
- En el suelo contaminado se obtuvieron 176 aislados de bacterias heterótrofas.
- El 86,36% de bacterias heterótrofas utilizó el petróleo como fuente de carbono y energía en 24 – 96 horas.
- El 95,39% de bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo produjo biosurfactantes.
- El coeficiente máximo de rendimiento de surfactantes Y (p/x) fue de 0,053 gL⁻¹ o 5,3% con *Sphingobacterium* sp. 64M.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar la caracterización molecular de *Sphingobacterium* sp. 64M.
- Determinar la eficiencia de la degradación de hidrocarburos de petróleo por *Sphingobacterium* sp. 64M.
- Realizar la caracterización físico-química del biosurfactante producido por *Sphingobacterium* sp. 64M.

VIII. RESUMEN

La biodegradación de hidrocarburos de petróleo es favorecida por la producción de biosurfactantes, no contaminantes del ambiente. El objetivo de la presente investigación fue determinar el rendimiento de surfactantes producidos por bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo. Se colectaron muestras de suelo contaminado y las bacterias aisladas en agar nutritivo y Mac Conkey se consideraron degradadoras cuando utilizaron el petróleo como fuente de carbono y energía. Las bacterias productoras de surfactantes se seleccionaron mediante la prueba de dispersión en gota con los medios mínimo salino de Davis con 1% de glicerol y medio A con glucosa como fuente de carbono y con las tres bacterias que alcanzaron el mayor diámetro en el halo se determinó el rendimiento. En el suelo con un HTP de 21 200 mg Kg⁻¹ se obtuvieron 176 aislados de bacterias, entre los que 86,36% utilizó el petróleo como fuente de carbono y energía. El 95,39% de estas bacterias desarrollaron en medio mínimo con producción de biosurfactante, evidenciado por los halos de dispersión de petróleo liviano, con diámetros de 1,6-39,6 mm al inicio y 2,0-30 mm después de 5 minutos. El coeficiente máximo de rendimiento de surfactantes Y (p/x) fue de 0,053 gL⁻¹ con *Sphingobacterium* sp. 64M. La producción de surfactante y la capacidad para degradar hidrocarburos de petróleo demostró el potencial de las bacterias para la biorremediación de suelos contaminados.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, A., Pucci, G., Morales, M. & Pucci, O. (2010). *Biorremediación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia, Argentina. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30, 29-36.
- Araujo, I., Gómez, A., Barrera, M., Angulo, N., Morillo, G., Cárdenas, C. & Herrera, L. (2008). Surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas contaminadas con crudo liviano. *Interciencia*, 4(33), 245-250.
- Ayasta, J. & Bernable, C. (2012). *Mejoramiento del proceso del compostaje de residuos sólidos urbanos biodegradables del distrito de Ciudad Eten, en Lambayeque. Julio a Diciembre de 2011*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Braibant, C. (2004). *Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por Acinetobacter sp. y Pseudomonas putida para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados*. (Informe de Práctica de Especialidad). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.
- Brenner, D.J., Krieg, N. R. & Staley, J. T. (2004). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria*, 2(1). doi: 10.1007/bergeysoutline200405.
- Buendía, H. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante compost de aserrín y estiércoles*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Burgos, C., Pons, R., Espuny, M. J., Aranda, F. J., Teruel, J. A., Manresa, A., Ortiz, A. & Marqués, A. M. (2011). Aislamiento y caracterización parcial de una mezcla de biotensioactivos producidos por *Sphingobacterium detergens* sp. nov. aislada desde suelo. *Journal of Colloid and Interface Science*, 361, 195-204.
- Burgos, C. (2012). *Biotensioactivos producidos por Sphingobacterium detergens sp. nov.: Producción, caracterización y propiedades*. (Tesis de Doctorado). Universitat de Barcelona, España.

- Cando, M. (2011). *Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. (Tesis de Ingeniería). Universidad Politécnica de Salesiana, Ecuador.
- Chávez, G. (2010). *Eficiencia de la degradación de petróleo por Pseudomonas sp. nativa en terrarios a diferentes concentraciones y tiempos*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Dorán, P. (1998). *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. España: Editorial Acribia, S.A.
- Escorza, J. (2007). *Estudio de inóculos bacterianos como biorremediadores de suelos contaminados con petróleo*. (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Flores, S. & Benites, J. (2016). *Efecto del estiércol de cuy, porcino y vacuno en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de diésel en terrarios*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Galindo, M. & Llontop, J. (2015). *Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por bacterias nativas de la provincia de Talara, región Piura*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Giraldo, J. (2012). *Producción de ramnolípidos por Pseudomonas aeruginosa PB 25: evaluación de su actividad emulsificante y de remoción de metales pesados*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Gómez, S., Gutiérrez, D., Hernández, A., Hernández, C., Losada, M. & Mantilla, P. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 6(9), 76-84.
- Guzmán, C. & Hurtado, A. (2011). *Producción de polihidroxialcanoatos por bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de almidón contenido en cascara de Solanum tuberosum*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.

- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2003). *Metodología de la Investigación*. México: Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.
- Holt, J., Krieg, N., Snetl, P. & Stanley, J. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. USA.
- Huapaya, R. (2011). *Métodos Stándares de Análisis Microbiológicos de Aguas*. Curso de capacitación. 10 y 11 de diciembre 2011, Chiclayo.
- Jiménez, D., Medina, S. & Gracida, J. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 26(1), 65-84.
- Kim, H. S., Jeon, J. W., Kim, B.H., Ahn, C. Y., Oh, H. M. & Yoon, B. D. (2006). Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 70, 391-396.
- Llanos, C. (2011). *Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por bacterias nativas en el distrito de Pimentel*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- López, J. B., Quintero, G., Guevara, A. L., Jaimes, D.C., Gutiérrez, S. M. & García, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova – Publicación Científica*, 4(1), 82-90.
- Luna, M. (2005). *Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de un biosurfactante y remoción de fenantreno por Penicillium sp.* VI Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. La Habana, Cuba.
- Mondragón, L. (2011). *Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autóctonas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de MEOR*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
- Municipalidad Provincial de Talara. (2014). Piura, Perú. Recuperado de <http://www.munitalara.gob.pe/parinas-talara/>
- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Kochupappy, Ravi, T. & Sivachidambaram, P. (2008). Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science*, 94(6), 736-747.

- Nitschke, M. & Pastore, GM. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, 97, 336-341.
- 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.
- Pissani, V. & Cabanillas, J. (2015). *Efecto de la bioaugmentación y bioestimulación en la eficiencia de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Prince, D. (2014). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. (Tesis de ingeniería). Universidad del Bío-Bío, Chile.
- Raiger, L. & López, N. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Revista Química Viva*, 3(8), 146-161.
- Riojas, H., Torres, L., Mondaca, I., Balderas, J. & Gortáres, P. (2010). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Química Viva*, 3(9), 120-145.
- Rodríguez, L., van der Mei, H., Banat, IM., Teixeira, J. & Oliveira, R. (2006). Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 46,107-112.
- Rodríguez, C. (2012). *Producción de biogás a partir del bagazo cervecero*. (Tesis de Ingeniería). Universidad de Chile, Chile.
- Salas, T. & Meza, V. (2011). *Compost de etiquetas de cerveza. Evaluación de la fitotoxicidad en semillas*. Segundo Simposium de Residuos Sólidos en el Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Samanez, E. (2008). *Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

- Santa Anna, L., Sebastian, G., Menezes, E., Alves, T., Pereira, N. & Freire, D. (2002). Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19(2), 159-166.
- Sulbarán, M., Bahsas, A., Velásquez, W. & Otoniel, J. (2005). Caracterización de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de emulsiones de petróleo pesado. *Ciencia*, 13(2), 228-239.
- Uad, I. (2012). *Caracterización fisiológica y molecular de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de fondos marinos (Del Prestige)*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.
- Vásquez, A., Díaz, N., Vásquez, O. & Vásquez, W (2012). *Metodología de la Investigación Científica*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Viñas, M. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

X. ANEXOS

ANEXO 1

Cálculo del número de muestras de suelo para el aislamiento de bacterias degradadoras de petróleo

$$n = \frac{Z^2 (p \cdot q)}{t^2}$$

Donde:

n = Tamaño de muestra

Z=1,96 (α = 0,05); valor estándar

p = Presencia de bacterias en suelo contaminado con petróleo: 0,90

q = Ausencia 1-p: 0,10

t = Error permitido: 8 %

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90 \cdot 0,10)}{(0,08)^2}$$

n = 54, 02 muestras de suelo contaminado con petróleo

Anexo 2

Composición (gL⁻¹) de medios de cultivo para el aislamiento de bacterias heterótrofas (Pissani & Cabanillas, 2015).

Caldo nutritivo (gL⁻¹)

Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Peptona	5,0
Agua destilada csp	1000 mL

Agar Plate Count (gL⁻¹)

Triptona	5,0
Dextrosa	1,0
Extracto de Levadura	2,5
Agar	12,0
Agua destilada csp	1000 mL
pH final	7,0

Agar Mac Conkey (gL⁻¹)

Peptona de gelatina	17,0
Peptona de caseína	1,5
Peptona de carne	1,5
NaCl	5,0
Lactosa	10,0
Sales biliares	1,5
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
Agar agar	13,5
Agua destilada csp	1000 mL
pH	7,0

Caldo Bushnell Haas (gL⁻¹)

KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄	0,20
Cl ₂ Ca	0,02
FeCl ₃	0,005
Agua destilada csp	1000 mL
pH	7,0

Caldo extracto de levadura etanol (gL⁻¹)

KH ₂ PO ₄	18,0
K ₂ HPO ₄	6,0
MgSO ₄	0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,0
Extracto de levadura	3,0
Etanol	20,0 mL
Agua destilada csp	1000 mL
pH	7,0

ANEXO 3

Cálculo del NMP para bacterias hidrocarbonoclasticas

Donde:

(Tabla NMP/100 mL) = valor dado en la tabla según el código.

Tabla NMP/100 mL

Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos			
0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	NMP
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

Anexo 4

Composición (gL⁻¹) de medios de cultivo para la detección de bacterias productoras de surfactantes (Sulbarán *et al.*, 2005; Mondragón, 2011).

Medio A (gL⁻¹)

KH ₂ PO ₄	0,40
K ₂ HPO ₄	1,60
NH ₄ Cl	1,50
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,17
NaSO ₄ 7H ₂ O	0,79
CaCl ₂	0,045
Glicerol	1 mL
Glucosa	20,00
Solución de elementos traza*	1 mL

*0,29 gL⁻¹ ZnSO₄ 7H₂O, 0,24 gL⁻¹ CaCl₂ 4H₂O, 0,25 gL⁻¹ CuSO₄ 5H₂O

Medio mínimo salino de Davis (gL⁻¹)

KH ₂ PO ₄	5,23
K ₂ HPO ₄	1,91
MgSO ₄	0,09
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
Glicerol	1 mL
Solución de elementos traza*	1 mL

*20 mgL⁻¹ CoCl₂, 30 mgL⁻¹ H₃BO₃, 10 mgL⁻¹ ZnSO₄, 1 mgL⁻¹ CuSO₄, 3 mgL⁻¹ Na₂MoO₄, 10 mgL⁻¹ FeSO₄, 2,6 mgL⁻¹ MgSO₄

Anexo 5

Tinción, fermentación, morfología y disposición de bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo

Cultivos bacterianos	Tinción Gram	Lactosa	Morfología	Disposición
A24	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
20E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
17M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A15	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
14E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F22	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
16E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F3	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F29	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
18E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
22E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F21	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F16	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
12E	Positivo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A9	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A36	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
45M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A28	Positivo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A14	Positivo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
15E	Positivo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F25	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F12	Negativo	Positivo	Bacilos cortos	Aislados
10E	Positivo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
33E	Negativo	Positivo	Bacilos cortos	Aislados
F24	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
19E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
34E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F11	Negativo	Positivo	Bacilos cortos	Aislados
35E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
23E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F17	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F28	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F14	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
17E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F23	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
13E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
21E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F13	Positivo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
24E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
11E	Positivo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F19	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F27	Negativo	Positivo	Bacilos cortos	Aislados
F20	Negativo	Positivo	Bacilos cortos	Aislados
F6	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
K45	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
25E	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
F7	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
27E	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
28E	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados

30E	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
31E	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
F1	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
32E	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
36E	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
F4	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
41E	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
43E	Negativo	Positivos	Cocobacilos	Aislados
A11	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
F8	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
26E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
29E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
K2	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Agrupados
F10	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Agrupados
A13	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
K23	Positivo	Negativo	Cocos	Agrupados
40E	Positivo	Negativo	Cocos	Agrupados
A16	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A37	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
L43	Positivo	Positivo	Cocos	Agrupados
A35	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
81M	Positivo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
A8	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
19M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A30	Positivo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A18	Positivo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
21M	Positivo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
42M	Positivo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
80M	Negativo	Positivo	Cocobacilos	Aislados
A7	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
10M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
23M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A27	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A47	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
95M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
L24	Positivo	Negativo	Cocos	En cadena
F18	Positivo	Negativo	Cocos	En cadena
L52	Negativo	Negativo	Bacilos pleomórficos	Aislados
F2	Negativo	Negativo	Bacilos pleomórficos	Aislados
66M	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
K50	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A81	Negativos	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
67M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
K13	Positivo	Negativo	Cocos	Aislados
70M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
K47	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
55M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
K6	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
A51	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A3	Negativo	Negativo	Bacilos pleomórficos	Empalizada
F5	Negativo	Negativo	Bacilos pleomórficos	Empalizada
A52	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
K22	Negativo	Positivo	Bacilos cortos	Aislados
A25	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A21	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
64M	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
A38	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados

61M	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
A45	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Agrupados
A12	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
61M	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
A26	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A20	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A22	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
L3	Negativo	Positivo	Cocobacilos	Aislados
A44	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
K40	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A31	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
18M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A49	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
41M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A64	Negativo	Positivo	Cocobacilos	Aislados
A29	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A93	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
56M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
L49	Positivo	Positivo	Cocos	Aislados
39E	Positivo	Positivo	Cocos	Aislados
K4	Positivo	Negativo	Cocos	Racimo
68M	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
A80	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
24M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
60M	Negativo	Positivo	Cocobacilos	Aislados
A34	Negativo	Negativo	Cocobacilos	Aislados
96M	Positivo	Negativo	Cocos	Racimo
K49	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A46	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
K9	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
98M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
K12	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Agrupados
2M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
79M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
K44	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Aislados
A86	Negativo	Positivo	Bacilos cortos	Agrupados
87M	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Agrupados
K8	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Agrupados
L9	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Agrupados
F15	Negativo	Positivo	Bacilos cortos	Agrupados
37E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Agrupados
F26	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Agrupados
42E	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Agrupados
76M	Positivo	Negativo	Cocos	Racimo
38E	Positivo	Negativo	Cocos	Racimo
F9	Positivo	Negativo	Cocos	Racimo

Anexo 6

Diámetro del halo de dispersión de bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo cultivadas en medio mínimo salino de Davis

Cultivos bacterianos	Diámetro del halo de dispersión (mm)		Tiempo (min)					
			0			5		
	r ₁	r ₂	r ₃	r ₁	r ₂	r ₃		
95M	36	40	43	32	33	34		
A51	43	35	35	30	27	28		
K6	36	35	35	28	29	28		
64M	35	31	35	25	25	26		
67M	33	34	33	21	26	26		
55M	29	32	38	19	27	28		
A27	33	34	25	23	27	19		
68M	27	23	24	24	21	21		
66M	25	25	21	20	20	18		
56M	18	22	20	16	17	16		
A80	20	22	18	15	17	14		
A93	16	20	18	15	17	14		
70M	16	17	16	15	16	15		
A45	17	17	11	12	12	8		
33E	17	17	11	13	11	8		
F24	16	18	11	12	12	8		
A44	10	12	13	6	7	8		
19E	11	11	13	6	7	8		
34E	10	13	12	7	8	6		
A52	10	10	11	8	8	8		
F11	12	9	10	7	9	8		
A35	9	10	9	7	9	7		
35E	9	9	10	9	7	7		
23E	9	10	9	10	6	7		
K45	7	7	7	6	6	6		
F17	8	6	7	6	6	6		
F28	7	7	7	7	5	6		
K4	6	7	7	5	6	6		
F14	7	7	6	6	5	6		
17E	7	7	6	5	6	6		
L24	6	7	6	4	5	4		
F23	6	6	7	4	5	4		
13E	6	7	6	5	4	4		
18M	6	6	6	5	5	5		
K2	6	6	6	5	5	5		
F13	7	5	6	6	4	5		
11E	6	6	6	5	5	5		
F20	6	6	6	6	5	4		
A36	6	6	6	6	6	6		
A11	5	6	7	5	6	7		
F6	6	6	6	7	5	6		
F8	7	5	6	5	6	7		
26E	7	6	5	7	6	5		
K47	5	5	7	4	4	5		
25E	7	5	5	4	4	5		
F7	5	5	7	5	5	3		
L43	5	5	5	4	4	3		

...continuación

27E	6	4	5	4	3	4
28E	5	5	5	4	4	3
87M	5	4	5	3	4	2
30E	4	5	5	4	2	3
31E	5	4	5	4	3	2
K12	4	4	5	3	3	4
32E	4	4	5	3	3	4
36E	5	4	4	4	3	3
F1	5	4	4	4	3	3
K23	3	4	5	3	4	5
F4	3	4	5	3	4	5
A38	3	3	5	3	3	4
41E	5	3	3	3	3	4
43E	3	3	5	4	4	2
62M	3	4	4	3	3	3
A12	3	3	5	3	3	5
A21	4	3	3	4	3	3
L9	3	3	4	3	3	4
F15	4	3	3	4	3	3
37E	3	4	3	4	4	2
A64	3	3	4	2	2	3
24M	3	3	3	3	3	3
A14	3	3	3	3	3	3
A25	2	3	4	2	3	4
A22	3	3	3	3	3	3
19M	3	3	3	3	3	3
F26	3	3	3	3	3	3
42E	3	4	2	3	3	3
38E	3	3	3	3	3	3
A16	3	3	3	2	3	3
K8	3	3	3	2	3	3
F9	3	3	3	3	2	3
39E	3	3	3	3	3	2
L49	3	3	3	2	2	2
A15	3	3	3	2	2	2
A8	3	3	3	2	2	2
40E	3	3	3	2	2	2
F10	3	3	3	2	2	2
F18	3	3	3	2	2	2
41M	3	2	3	2	1	1
F2	3	3	2	2	1	1
F5	2	3	3	1	2	1
10M	3	3	2	3	2	2
45M	2	3	3	2	2	3
20E	2	3	3	2	3	2
14E	2	3	3	2	3	2
K49	2	3	3	2	3	3
81M	2	3	3	2	3	3
2M	2	3	3	2	3	3
A34	2	3	3	2	3	3
96M	3	3	2	3	3	2
F22	2	3	3	3	3	2
24E	2	3	3	2	3	3
F3	3	3	2	2	3	3

...continuación

A86	2	3	2	2	2	2
A20	2	3	2	2	2	2
F27	2	3	2	2	2	2
F19	2	3	2	2	2	2
16E	2	3	2	2	2	2
F21	2	2	3	2	2	2
22E	2	2	3	2	2	2
A49	3	2	2	2	1	1
18E	3	2	2	1	1	2
F29	3	2	2	1	2	1
F17	3	2	2	2	1	1
F28	3	2	2	2	1	1
K13	2	2	3	2	2	3
K44	2	2	3	2	2	3
A31	2	2	3	2	2	3
A37	2	3	2	2	3	2
76M	2	2	3	2	2	3
A9	3	2	2	3	2	2
29E	2	2	3	3	2	2
21E	2	2	3	2	2	3
13E	3	2	2	2	2	3
L52	2	2	2	2	2	2
60M	2	2	2	2	2	2
61M	2	2	2	2	2	2
80M	2	2	2	2	2	2
17M	2	2	2	2	2	2
42M	2	2	2	2	2	2
A3	2	2	2	2	2	2
A7	2	2	2	2	2	2
A13	2	2	2	2	2	2
A18	2	2	2	2	2	2
A24	2	2	2	2	2	2
A28	2	2	2	2	2	2
A30	2	2	2	2	2	2
A47	2	2	2	2	2	2
K40	2	2	2	2	2	2
A26	2	2	2	2	2	2
98M	2	2	2	2	2	2
K50	2	2	2	2	2	2
A81	2	2	2	1	1	1
A46	2	2	2	1	1	1
23M	2	2	2	1	1	1
21M	1	2	2	1	2	2
A29	1	2	2	1	2	2

Anexo 7

Diámetro del halo de dispersión de bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo cultivadas en medio A

Diámetro del halo de dispersión (mm)	Tiempo (min)					
	0			5		
	r ₁	r ₂	r ₃	r ₁	r ₂	r ₃
Cultivos bacterianos						
66M	9	7	7	8	6	7
68M	7	7	7	6	6	6
K6	7	7	7	6	6	6
20E	7	7	7	6	6	6
14E	7	7	7	6	6	6
F22	7	7	7	6	6	6
24E	7	7	7	6	6	6
67M	7	6	7	7	6	7
A52	6	7	6	6	6	5
A45	6	6	6	6	6	6
56M	6	6	6	6	6	6
F3	6	6	6	6	6	6
F27	6	6	6	6	6	6
55M	8	6	4	6	6	4
A27	4	6	7	4	6	7
24M	6	5	5	6	4	5
A80	6	3	6	6	3	5
23M	4	5	4	4	5	4
A51	4	4	4	4	4	4
22E	4	4	4	4	4	4
95M	3	3	6	3	3	6
F19	3	3	6	3	3	6
16E	3	3	6	3	3	6
F21	3	3	6	3	3	6
A13	4	4	4	1	2	2
A16	5	4	2	5	4	2
98M	3	3	5	3	3	5
18E	3	3	5	3	3	5
A30	3	2	5	3	2	5
F29	3	2	5	3	2	5
A37	2	4	4	2	4	4
F17	2	4	4	2	4	4
F28	2	4	4	2	4	4
A20	2	3	5	2	2	5
A44	3	4	3	2	2	2
A22	2	3	4	2	3	4
21E	2	3	4	2	3	4
29E	2	3	4	2	3	4
21M	2	3	2	2	3	2
K4	2	2	2	2	2	2
1M	2	2	2	2	2	2
A12	2	2	2	2	2	2
A8	2	2	2	2	2	2
13E	2	2	2	2	2	2
15E	2	2	2	2	2	2
12E	2	2	2	2	2	2

...continuación

F16	2	2	2	2	2	2
A21	1	2	2	1	2	2
K8	2	1	2	1	0	1
L27	2	1	1	2	1	1
A24	1	1	2	1	1	2
F25	1	1	2	1	1	2
F12	1	1	2	1	1	2
10E	1	1	2	1	1	2
K44	2	1	1	1	1	1
K40	1	1	1	0	0	0
