

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

ESCUELA DE POSGRADO

**SECCIÓN DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

MAESTRÍA EN CIENCIAS

MENCIÓN: SANEAMIENTO ALIMENTARIO Y AMBIENTAL



**Microorganismos con capacidad degradativa de aceites
lubricantes usados, aislados de estratos superficiales de
suelos contaminados y optimización de condiciones de
crecimiento. Ayacucho 2009.**

Tesis para obtener el grado académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

Mención en SANEAMIENTO ALIMENTARIO Y AMBIENTAL

Presentado por:

Bach. Sonia Haydeé PALOMINO FELICES

AYACUCHO – PERÚ

2014

111
003,
Pal

A mi familia por ser mi fortaleza.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por haberme brindado la oportunidad de estudiar en sus aulas.

A los docentes de la Escuela de Post Grado de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Mi especial agradecimiento a mi amigo, colega y asesor Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez.

A Mis amigos Mg. Paula García Godos Alcázar y Mg. Fidel Mujica Lengua por su apoyo incondicional en esta etapa de estudios.

Al Mg. Reynan Cóndor Alarcón y al Mg. Alex Tineo Bermúdez, por su ayuda en el análisis estadístico de los datos del presente trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Antecedentes	5
2.2 Bases teóricas	15
2.2.1 Biorremediación	15
2.2.1.1 Tipos de Biorremediación	16
2.2.1.1.1 Degradación enzimática	16
2.2.1.1.2 Biorremediación Microbiana	17
2.2.1.1.3 Fitorremediación	19
2.2.2 Bacterias Degradadoras de Hidrocarburos	20
2.2.2.1 Fundamento Bioquímico de la Biodegradación de Hidrocarburos por microorganismos	23
2.2.2.2 Degradación de Hidrocarburos Alifáticos en Presencia de oxígeno	23
2.2.3 Aceite Lubricante	25
III MATERIALES Y MÉTODOS	28
1 Preliminares para la investigación	28
2 Obtención de muestras	28
3 Procesamiento de muestras	29
4 Aislamiento de microorganismos	30
5 Degradación de "aceite lubricante usado" en suelos	30
6 Bioensayos	31
7 Optimización de parámetros para la degradación de "aceite lubricante usado"	32
8 Identificación de cepas degradadoras de "aceite lubricante usado"	34
IV RESULTADOS	35
V DISCUSIÓN	54
VI CONCLUSIONES	63
VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
VIII ANEXOS	69

Título: Microorganismos con capacidad degradativa de aceites lubricantes usados, aislados de estratos superficiales de suelos contaminados, optimización de condiciones de crecimiento. Ayacucho 2009.

Autora: Bach. Sonia Haydeé Palomino Felices.

Asesor: Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez.

RESUMEN

La biorremediación, consiste principalmente en el uso de los organismos nativos (bacterias, hongos, plantas) para descomponer o degradar sustancias peligrosas convirtiéndolas en sustancias de caracteres menos tóxicos o inocuos para el ambiente y la salud humana. La investigación tuvo los siguientes objetivos: a) utilizar los microorganismos aislados de suelos contaminados con hidrocarburos para degradar "aceite lubricante usado" en suelos de experimentación en condiciones de laboratorio, b) evaluar la degradación de "aceite lubricante usado" por microorganismos, en suelos, mediante bioensayos, con semillas de "col rizada" *Brassica oleracea* y "raigrás" *Lolium perenne*, c) optimizar los parámetros de pH, temperatura y fuente de nitrógeno para los microorganismos con capacidad degradativa de "aceite lubricante usado" y d) identificar las especies de microorganismos con capacidad degradativa de "aceite lubricante usado". El trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se aislaron tres consorcios microbianos, con los que se biorremediaron suelos contaminados *in vitro*, con concentraciones de 2, 4, 8 y 16 % de "aceite lubricante usado", luego con estos suelos se hicieron bioensayos con semillas de "col rizada" *Brassica oleracea* y "raigrás" *Lolium perenne* como fitoindicadores y se efectuaron pruebas para determinar los parámetros óptimos de crecimiento y capacidad degradativa del Consorcio Microbiano Uno.

En el ensayo de biodegradación del "aceite lubricante usado", los tres consorcios microbianos aislados, tuvieron diferentes comportamientos, a pesar de la no significancia estadística, se eligió el Consorcio Microbiano Uno para continuar con la investigación por la mayor tendencia de actividad degradativa del contaminante. La biorremediación de suelos contaminados con "aceite lubricante

usado" en condiciones *in vitro*, se efectuó durante 60 días, usando el Consorcio Microbiano Uno, evaluándose mediante bioensayos con "col rizada" *Brassica oleracea* y "raigrás" *Lolium perenne*, como fitoindicadores, logrando una germinación de 70% y 87% respectivamente. Las mejores condiciones de degradación del "aceite lubricante usado" por el Consorcio Microbiano Uno fueron: pH 6 y temperatura 30°C, referente a la influencia de las diferentes concentraciones de nitrato de amonio como fuente de nitrógeno, éstas no mostraron ninguna diferencia significativa, se identificó a: *Rodotorula sp.*, *Candida glabrata*, *Candida Krusei*, *Candida sp.* y dos cepas de *Bacillus sp.* en el consorcio Microbiano Uno.

Palabras claves: biorremediación, aceite lubricante usado, consorcio microbiano.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas ambientales más importantes en la actualidad es la contaminación de ecosistemas terrestres y acuáticos por derrames de petróleo y sus derivados. En el caso del suelo, las principales consecuencias ambientales que se presentan después de un evento de contaminación por hidrocarburos y sus derivados son; la reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal del lugar del derrame, cambios en la dinámica poblacional de la fauna y la biota microbiana y contaminación por infiltración de cuerpos de agua subterráneos. Además del impacto ambiental negativo, los derrames de hidrocarburos generan impactos de tipo económico, social y de salud pública en las zonas aledañas al lugar afectado (Pardo y col., 2004).

En los ecosistemas terrestres, el suelo representa el medio físico que sustenta la vida de diversas especies, tanto animales como vegetales. La materia orgánica e inorgánica del suelo da cabida a la coexistencia de una gran cantidad de microorganismos que se adaptan a sus características físicas y químicas aún cuando estas sean variables. Los microorganismos tienen una gran importancia ecológica en los sistemas terrestres, pues cumplen la función de descomponer sustancias orgánicas de desecho en sus componentes básicos, los cuales se

metabolizan junto con los nutrientes obtenidos del suelo, para generar nueva biomasa y llevar a cabo sus funciones vitales (Pardo y col., 2004).

Los hidrocarburos y sus derivados, como el aceite lubricante, está constituido por un conjunto de moléculas formados principalmente por carbono e hidrógeno con contenidos menores de otros elementos como azufre, oxígeno, nitrógeno o trazas de metales, dependiendo del lugar de origen. Los incidentes de contaminación pueden ser remediados mediante eventos naturales que ocurren en el medio contaminado, por ejemplo; en los suelos se presentan procesos de atenuación natural que viene a ser la capacidad de los suelos para degradar cantidades de sustancias orgánicas; estos procesos están ligados a actividades metabólicas de microorganismos -proceso denominado biorremediación-, pero también se presentan procesos físicos y químicos tales como; lavado, volatilización, fotodescomposición, hidrólisis, entre otros (Pardo y col., 2004).

Cuando el hombre empezó a actuar sobre los espacios contaminados en los años 1980, el método consistía en retirar los residuos y/o suelo contaminado a un vertedero o cubrirlos con una capa impermeable (confinamiento). Más tarde, se planteó la necesidad de desarrollar alternativas para solucionar de forma más permanente y menos costosa el problema de los espacios contaminados. En consecuencia, el desarrollo y uso de tecnologías más apropiadas para el tratamiento de suelos contaminados ha avanzado mucho y en la actualidad es un tema de gran interés por sus repercusiones económicas y sociales (Martín y col., 2004).

La rápida expansión y la sofisticación creciente de diferentes sectores industriales, fundamentalmente en los últimos treinta años, se han traducido en un incremento de la cantidad y la complejidad de residuos tóxicos. Al mismo tiempo, se ha ido desarrollando una conciencia social de este peligro que lentamente va forzando el establecimiento de legislación para reducir la

producción de residuos contaminantes y prevenir el escape de los mismos al medio circundante. Algunos accidentes que han supuesto un elevado impacto ambiental como el vertido de combustibles, la liberación de productos radiactivos o la rotura de la presa, han puesto de manifiesto la justificada preocupación y alarma que estos temas suscitan en el conjunto de la población y lo mucho que queda por hacer para prevenir y finalmente resolver adecuadamente ese tipo de situaciones (Martín y col., 2004).

Según lo descrito en los párrafos anteriores, es importante entender que, para mantener la calidad del ambiente es esencial el tratamiento de suelos contaminados. Al iniciar la investigación, observamos que el aceite lubricante es uno de los contaminantes importantes en los suelos de los talleres de reparación de motores y en suelos de los grifos y establecimientos que venden aceites lubricantes situados en nuestra localidad, especialmente en zonas de reparación de motores y de uso de maquinarias, debido a que el aceite lubricante está relacionado con la generación de energía y usado en todo tipo de motores, ocurren derrames accidentales y provocados, cuyos autores vienen a ser el personal que trabaja en los talleres, con el pretexto de impermeabilizar el suelo al interior de los talleres de reparación de motores, los establecimientos de venta y las zonas aledañas de este modo evitar la polvareda. Esta situación no constituye un problema ambiental focalizado, sino que el aceite lubricante puede infiltrarse y contaminar los cuerpos de agua subterráneos. En esta situación se hace indispensable la aplicación de tratamientos de biorremediación a bajo costo y que sean accesibles. La biorremediación es una herramienta efectiva para mejorar la degradación de contaminantes en suelos. El uso de microorganismos aislados de los suelos contaminados con aceite lubricante y magnificados en condiciones de laboratorio, pueden constituir una ayuda importante para acelerar

el proceso de descomposición y degradación de los aceites lubricantes vertidos en suelos.

En las investigaciones que se realizan a nivel nacional y mundial relacionados con este tema, se trata de mantener un equilibrio entre la actividad del hombre y el cuidado o restauración del ambiente. Con esta finalidad se planteó la investigación, el cual tuvo los siguientes objetivos:

- Utilizar los microorganismos aislados de suelos contaminados con hidrocarburos para degradar "aceite lubricante usado" en suelos de experimentación en condiciones de laboratorio.
- Evaluar la degradación de "aceite lubricante usado" por microorganismos, en suelo, utilizando semillas de "col rizada" *Brassica oleracea* y "raigrás" *Lolium perenne*
- Optimizar los parámetros de pH, temperatura y fuente de nitrógeno de los microorganismos con capacidad degradativa de "aceite lubricante usado".
- Identificar las especies de microorganismos con capacidad degradadora de "aceite lubricante usado".

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

La búsqueda de mecanismos para disminuir la contaminación ambiental es una preocupación de muchos investigadores, por lo que, en los últimos años se han realizando investigaciones para mejorar los ambientes contaminados, de los que podemos citar los siguientes:

Araujo y col. (2004), realizaron el trabajo de investigación en Venezuela, sobre la biorremediación de suelos contaminados con petróleo utilizando cepas bacterianas autóctonas de suelos contaminados con hidrocarburos, las cepas que aislaron se sometieron a una prueba de eficiencia para la remoción de gasoil (fuente de carbono). Al realizar recuentos bacterianos de heterótrofos mesófilos, con las cepas denominadas 16, 14, 11, 18 y 1 presentaron los mayores porcentajes de remoción de hidrocarburos totales, 90, 63, 56, 49 y 45% respectivamente; las que seleccionaron para su utilización como cultivos mixtos en la prueba piloto. Realizaron una prueba piloto aplicando los tratamientos: cultivo mixto, compostaje y fertilización en unidades experimentales que contenían suelo contaminado. La correlación entre los heterótrofos mesófilos con los hidrocarburos totales, nitrógeno y fósforo, resultó negativa y altamente significativa ($p < 0,001$), lo que establece que el aumento de los heterótrofos

mesófilos provoca la disminución de los hidrocarburos totales, del nitrógeno y del fósforo. La prueba de Tukey, estableció que los tratamientos con cultivo mixto + fertilización (CM+N/P), compostaje + fertilización (Comp + N/P), compostaje + cultivo mixto + fertilización (Comp + CM + N/P) y compostaje + cultivo mixto (Comp + CM) no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos y en los que se obtuvo una remoción de los hidrocarburos totales del 95, 94, 93 y 86% respectivamente, durante los tres meses del estudio. La aplicación simultánea de la técnica de compostaje, fertilización y consorcio bacteriano demostró ser una buena alternativa para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Gamboa, R. (2004), al realizar el aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos en suelos contaminados de la ciudad de Ayacucho, usó caldo Tauson con nitrato, urea o amonio como fuentes de nitrógeno con una concentración de petróleo de 1,4 ml/100ml, las muestras se obtuvieron de suelos contaminados con hidrocarburos de talleres automotrices de la ciudad de Ayacucho. Para la identificación realizó coloraciones diferenciales y pruebas bioquímicas, identificando cuatro géneros de bacterias: *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Aeromonas sp.* y *Pseudomonas sp.*

Barzola, I. (2004), Evaluó la capacidad degradadora de cepas bacterianas nativas en suelos contaminados experimentalmente con petróleo, en Ayacucho, para lo cual usó las cepas de *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.* y *Alcaligenes sp.* las cuales fueron inoculadas en cubetas con suelo de jardín con 5, 10 y 15 % de petróleo D2, la biodegradación se llevó a cabo durante tres meses, y luego evaluó la capacidad degradadora de los microorganismos: individuales y en consorcios. Luego realizó bioensayos usando: maíz, alfalfa y quinua, para determinar la capacidad de degradación del contaminante, evaluando: el

porcentaje de semillas y el tamaño de plantas. Las cepas de *Pseudomonas sp.* y *Aeromonas sp.* mostraron mayor capacidad biodegradadora de petróleo D2.

Lopolito y col. (2006), al realizar estudios en Argentina, sobre la biodegradación de hidrocarburos de petróleo y sustancias relacionadas empleando diferentes sustratos orgánicos (crudo de petróleo, kerosene, aceite lubricante y benceno), usaron tres inóculos diferentes desarrollados a partir de una muestra de agua superficial con alto grado de contaminación en reactores "batch" alimentados con crudo de petróleo y aceite lubricante para automotores. Como nutrientes utilizaron medio mínimo salino (MM) y fertilizante foliar comercial. Los ensayos se realizaron en matraces de 1000 ml, con agitación continua y en condiciones de esterilidad, de manera tal que sólo pudieran desarrollarse aquellos microorganismos con capacidad de utilizar los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. La biodegradación fue evaluada a través de la estimación de la biomasa microbiana (recuento de bacterias viables en placa y consumo de oxígeno) y la concentración de hidrocarburos totales en la fase disuelta (DQO y lectura infrarrojo). Se determinaron proteínas totales e hidratos de carbono con el fin de observar la posible liberación de biosurfactantes.

Marín (2001), realizó su trabajo de investigación en España, sobre regulación de la degradación de alcanos en tres estirpes bacterianas aisladas de lugares contaminados por petróleo. En la investigación, desarrolló estudios sobre la expresión de los genes que codifican alcano hidroxilasas, que es la enzima que oxida la molécula terminal de los alcanos, usando las cepas *Burkholderia cepacia* RR10, *Pseudomonas aeruginosa* RR1 y *Alcanivorax borkumensis* AP1, de los estudios se tuvo los siguientes resultados; (a) las alcano hidroxilasas sólo se expresan si existen alcanos en el medio susceptibles de ser metabolizados; (b) en la fase de crecimiento de las bacterias, la expresión de las alcano hidroxilasas no es constante a lo largo del tiempo, sino que cada una de ellas se expresa en

un momento concreto del crecimiento; (c) la existencia de otras fuentes de carbono en el medio además del alcano, es decir, la expresión de las alcano hidroxilasas está sujeta a represión catabólica; (d) la expresión de la alcano hidroxilasa de *B. cepacia* RR10 se induce con alcanos de entre 12 y 30 átomos de carbono. En el caso de los dos alcanos hidroxilasas de *P. aeruginosa* RR1, su expresión se induce con alcanos de entre 12 y, al menos, 20 átomos de carbono; (e) el hecho de que la expresión de las alcano hidroxilasas de *B. cepacia* RR10, *P. aeruginosa* RR1 y *A. borkumensis* AP1 esté sujeta a represión catabólica sugiere que los alcanos no son sustratos de crecimiento preferentes para las bacterias, por lo cual, no se expresarán si existen otras fuentes de carbono más favorables en el medio. Estos resultados son importantes para el diseño de estrategias de biorremediación en los que se requiera estimular artificialmente el crecimiento de las bacterias biodegradadoras, y de sistemas de biotransformación basados en estas enzimas.

Pardo y col. (2004), en la investigación realizada en Colombia, sobre efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos en suelos contaminados de petróleo, se evaluó la técnica de biolabranza o desarrollo *in vitro*. A través de un diseño de seis unidades experimentales (UE) que contenían suelo contaminado con petróleo crudo; tres UE fueron tratadas con fertilizante inorgánico triple 15, y las otras fueron tomadas como control biótico. La efectividad de la *biolabranza* se determinó por medio de análisis de pH, porcentaje de humedad, temperatura, recuento de microorganismos heterótrofos totales y número más probables de microorganismos degradadores de petróleo, nutrientes e hidrocarburos totales, durante un periodo de experimentación de cuatro meses. Al final del tiempo de experimentación, para el tratamiento de *biolabranza* con adición de nutrientes, se lograron porcentajes de remoción altos de Hidrocarburos totales de petróleo

(TPH), hasta un 91%, alcanzando concentraciones finales de TPH de 2028 ppm, en comparación con el control biótico en el cual se obtuvieron porcentajes de remoción hasta del 65% y las concentraciones finales de 8049 ppm de TPH; de manera que se logró demostrar que la adición de nutrientes optimiza el proceso de degradación de hidrocarburos en suelos.

Bracho y col. (2004), al realizar estudios sobre biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas sp.* en la Universidad del Zulia, Maracaibo en Venezuela, evaluaron la capacidad de 14 cepas de *Pseudomonas*, para degradar hidrocarburos aromáticos dicíclicos, tricíclicos y heterocíclicos tales como; naftaleno, antraceno, fenantreno y dibenzotiofeno, constituyentes de la fracción aromática del petróleo. Con este fin, los hidrocarburos disueltos en solventes orgánicos fueron rociados en placas de agar, formando una capa opaca de sustrato, sobre la cual fueron inoculados los microorganismos. Las bacterias capaces de degradar los hidrocarburos se detectaron al presentar crecimiento visible o aparición de zonas claras en la capa de los hidrocarburos, fenómenos que evidencian la solubilización y utilización sustrato. Como resultado se encontró que el 100% las cepas estudiadas fueron capaces de degradar hidrocarburos naftaleno y antraceno, el 78,57% degradó fenantreno, el 71,42% dibenzotiofeno y el 50% los cuatro. Estos resultados demuestran que las cepas aisladas poseen capacidades enzimáticas diferentes para degradar estos compuestos. Asimismo permitieron seleccionar cepas capaces de degradar algunos los constituyentes de la fracción aromática de petróleo, característica que las hace ideales para su utilización en ensayos de biorremediación en suelos impactados con petróleo.

Vallejo y col. (2005), al realizar estudios sobre la bioestimulación de la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en suelos contaminados con petróleo, en Colombia, evaluaron el efecto de la adición de

nutrientes (N y P) en forma de sales inorgánicas simples y un fertilizante inorgánico compuesto en la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH). Se emplearon mesocosmos con suelo contaminado (20000 mg TPH/Kg_{ps}) y se evaluó un control abiótico y un control sin nutrientes. El estudio se realizó durante 125 días con 5 eventos de muestreo. Las mayores tasas de degradación de TPH se observaron durante los 28 primeros días. De los microorganismos aislados en el estudio la especie *Stenotrophomonas maltophilia* fue la especie predominante durante el estudio.

Abril (2004), evaluó la eficiencia de prácticas de manejo y de hábitat usando microorganismos para degradar efluentes en una industria metalúrgica de Córdoba, Argentina. Para optimizar la actividad de organismos del agua, el suelo y la rizósfera de las plantas, se manejaron tres hábitats; acuático, de humedales y agrícola. Las prácticas fueron; introducción de vegetación palustre y terrestre, aireación del agua, laboreos, remoción de sedimentos e inoculación con bacterias autóctonas. El pH registrado estuvo entre 8,4 y 10,9 la cantidad de bacterias descomponedoras usadas como inóculo estuvo en una concentración de log 3,6 y 8,9 /ml. Los sedimentos presentaron elevado pH, Zn y Cr y escaso contenido de aceites. No se detectaron estos contaminantes ni en el suelo ni en la napa. Mediante el manejo de hábitat se logró una eficiente degradación de los aceites del efluente y una ausencia total de lixiviados, barros y agua remanente.

Castro-Carrillo y col. (2008), realizaron estudios sobre la remoción de fenantreno con *Azolla caroliniana* "helecho" y microorganismos hidrocarbonoclastas, constituidos por *Bacillus stearothermophilus* y *Oscillatoria sp.*, esta investigación es uno de los primeros reportes del efecto negativo del fenantreno sobre el crecimiento de *Azolla caroliniana* y sus microsimbiontes, así como del potencial de remediación de fenantreno por *Azolla caroliniana* mediante el uso de bioaumentación.

Martínez-Alonso y col. (2005), en el análisis del papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertido de petróleo. El equipo de trabajo se involucró en un proyecto europeo multidisciplinario, cuyo propósito era desarrollar sistemas modelo de los tapetes microbianos en el laboratorio que permitieran el estudio del efecto y la respuesta de este tipo de ecosistema a un vertido de petróleo. Las conclusiones más destacadas obtenidas por los distintos grupos de investigación que integraban este proyecto se resumen; (a) los tapetes microbianos desarrollados en el laboratorio muestran un comportamiento similar al observado en el ambiente natural; (b) Las cianobacterias filamentosas migran hasta la superficie y llegan a constituir una nueva capa bacteriana sobre el petróleo. El petróleo queda atrapado en el tapete entre la capa óxica por encima y una anóxica por debajo, originándose una situación favorable para la biodegradación; (c) tras el contacto con el petróleo se observa un cambio de su estructura comparada con la pertenecía a los no contaminados. Las cianobacterias producen exopolisacáridos que forman una matriz que emulsiona el petróleo y permite el desarrollo de la comunidad degradadora de petróleo; (d) las bacterias aeróbicas, son más activas en la matriz por la accesibilidad a los hidrocarburos y por la elevada producción de oxígeno por parte de las cianobacterias; (e) respecto a las bacterias fototróficas, las cianobacterias son los elementos estructurales más importantes de los tapetes, pero su papel en el ataque de los hidrocarburos todavía no está claro; (f) con respecto a las bacterias heterótrofas varios grupos bacterianos son seleccionados tras la contaminación, principalmente el género aeróbico *Marinobacter* y algunas bacterias reductoras de sulfato; (g) en los tapetes microbianos, la degradación biológica de los componentes del petróleo bajo condiciones anóxicas es lenta y presumiblemente, altamente selectiva. En las capas anóxicas, bajo el petróleo, las bacterias reductoras del sulfato son más

eficientes cuando coexisten con las bacterias rojas del azufre, para una mejor, aunque todavía lenta biodegradación; (h) las interacciones entre bacterias aerobias y anaerobias en la interface óxica-anóxica hace que la biodegradación sea más eficiente. En resumen, los estudios realizados en el marco de este proyecto ponen de manifiesto la eficiencia de los microcosmos para valorar el impacto de un episodio de contaminación con petróleo sobre los tapetes microbianos, a la vez que muestran la importancia que pueden tener estos ecosistemas para una buena recuperación de las zonas litorales que sufren una contaminación crónica o puntual.

Bracho y col. (2004), evaluaron la degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado de Zulia, Venezuela, aislaron un total de 37 cepas bacterianas, de los cuales 20 se identificaron como *Pseudomonas*, 9 como *Bacillus*, 6 como *Staphylococcus* y 2 como *Micrococcus* con respecto a la degradación de hidrocarburos mostraron como resultado que el 100% de las cepas estudiadas fueron capaces de degradar los hidrocarburos naftaleno y antraceno, el 78,57% degradó fenantreno, el 71,42% dibenzotiofeno y el 50 % los cuatro hidrocarburos. Mostrando que estas cepas poseen capacidades enzimáticas diferentes para degradar estos compuestos. La investigación tuvo como finalidad mostrar la capacidad que poseen algunas bacterias provenientes de suelos contaminados con petróleo para la degradación de hidrocarburos constituyendo éstas un potencial importante para la biorrecuperación de sustratos impactados.

Fonturbel y col. (2004), al realizar estudios sobre uso de algunos parámetros microbiológicos y bioquímicos para la evaluación de la contaminación por hidrocarburos y la biodegradación de los mismos, en la zona del lago Titicaca, San Pedro de Tiquina, Bolivia, se estudió la variación en el tiempo de la biomasa microbiana, el pH y la actividad enzimática (para proteasas, ureasas y

sacarosas), en suelos expuestos naturalmente a pequeñas vertientes de hidrocarburos. Se estudiaron muestras en época seca y de época de lluvias. La biomasa presentó un descenso hasta llegar a 0 meqC/Kg en época seca en la muestra tratada con hidrocarburos, las muestras de época de lluvias mostraron un comportamiento exponencial, en ambos casos. El análisis de pH mostró una tendencia a regularse en un rango de 5,50-5,60 a las dos semanas de actividad tanto en época de lluvias como en época de secano. Los análisis de actividad enzimática mostraron un comportamiento de tipo recíproco y polinomial de 2º grado para proteasas, ureasas y sacarosas, aunque se vio que las sacarosas no tienen sensibilidad a este tipo de contaminación. Los análisis de varianza efectuados mostraron diferencia significativa entre los tratamientos con hidrocarburos y los testigos. Los análisis de correlación de Pearson mostraron una correlación regular entre pH-biomasa y biomasa-proteasas, y una alta correlación entre proteasas-ureasas.

Gómez y col. (2006), en la investigación que realizaron para determinar la capacidad de degradación de compuestos orgánicos persistentes por bacterias marinas aisladas de sedimentos en el Caribe Colombiano, aislaron 82 cepas bacterianas a partir de muestras de sedimento del Caribe Colombiano, capaces de tolerar los contaminantes orgánicos persistentes en ambientes aeróbicos, de los cuales 64 sobrevivieron a condiciones de laboratorio, 43 se aislaron en medios de cultivo enriquecidos con plaguicidas organofosforados y 21 en medios con hidrocarburos, trabajaron con cultivos mixtos constituidos por 9 cepas bacterianas, para la degradación de hidrocarburos. Disminuyendo 68,61% de los compuestos contaminantes en 21 días. Se identificaron las cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos usando la secuencia del Gen 16 S del ARNr; *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacteriaceae bacterium*, *Pseudomonas sp.*, *Ralstonia sp.* y *Bacillus pumilus*.

Cárdenas y col. (2004), realizaron estudios en San Juan, Puerto Rico, con la finalidad de evaluar la influencia de la fertilización en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando lodos residuales, aplicaron seis tratamientos con diferentes proporciones de lodo y fertilizante, al cabo de tres meses lograron disminuir la presencia de hidrocarburos en 14,64; 41,98; 53,19; 38,47; 38,47; 47,46 y 62,68 %, los parámetros que se determinaron fueron; numeración de heterótrofos, concentración de hidrocarburos, concentración de nitrógeno, fósforo, materia orgánica, pH, humedad, presencia de hidrocarburos aromáticos, resinas y asfalto.

Acuña y col. (2008), estudiando los suelos de la Patagonia, Argentina, deficientes en nitrógeno, contaminados con petróleo, concluyen que es posible la biodegradación de hidrocarburos en suelos deficientes de nitrógeno en tiempos más prolongados en comparación a aquellos suelos en los cuales se realiza una fertilización con nitrógeno. El nitrógeno necesario para el proceso de biodegradación es obtenido por los microorganismos del suelo por fijación biológica.

Vásquez y col. (2010), al realizar la biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados, en Colombia, debido a que la contaminación con aceites lubricantes usados generan gran impacto ambiental negativo al no ser manejados adecuadamente. Propusieron la biorremediación para disminuir la concentración de dichos contaminantes. Los ensayos fueron realizados en las instalaciones de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de río Frío (Girón, Santander, Colombia), donde se evaluaron consorcios microbianos nativos, que posteriormente se adicionaron a las biopilas conformadas por lodos deshidratados provenientes del tratamiento primario de aguas residuales domésticas (usados como fuente de materia orgánica), lodos provenientes de lavaderos de carros y lodos de alcantarillado de la zona industrial de la ciudad de

Bucaramanga (Colombia). Se aislaron, identificaron y conservaron cepas microbianas con capacidad degradadora de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) como *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter sp.*, *Bacillus brevis*, *Micrococcus sp.* y *Nocardia sp.* se realizó una serie de pruebas piloto donde se inoculó cada montaje con un consorcio bacteriano a una concentración de 3×10^8 UFC/ml de bacterias y microorganismos fúngicos como *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Trichoderma sp.*, a una concentración de 1×10^6 esporas/ml; se monitorearon parámetros de temperatura, pH, humedad y oxigenación. Se realizaron dos ensayos para verificar el comportamiento de dichos tratamientos; se analizó la variable continua TPH en ppm mediante el método de modelos mixtos lineales en bloques aleatorios completos, que revelaron diferencias significativas entre la biopila control y las biopilas bajo prueba; se obtuvieron porcentajes de remoción hasta de 94% de TPH en 120 días y 84% en 40 días, lo que reflejó un efecto positivo en la utilización de los consorcios de microorganismos bajo prueba en la descontaminación de lodos de alcantarillado industrial y lodos de lavaderos de carros.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Biorremediación

Se denomina biorremediación a los procesos de degradación, biodegradación o ruptura de ciertos contaminantes químicos en la que intervienen plantas, microorganismos (hongos filamentosos, levaduras y bacterias) y sus enzimas, generando compuestos inocuos o menos agresivos para el entorno. La biorremediación es, un proceso de descontaminación y detoxificación de los contaminantes químicos presentes en un ambiente determinado por actividad de los seres vivos (Gómez, 2004).

La biorremediación se lleva a cabo usualmente en la naturaleza, operando en régimen aerobio (en medio oxidante) o anaerobio (en medio reductor), en el suelo y en el agua, pero con una velocidad muy baja que resulta generalmente obligado acelerarla cuando se desea utilizar en la recuperación de un medio contaminado (Gómez, 2004).

La biorremediación se puede clasificar como: *in situ* o *ex situ*. La primera consiste en tratar el material contaminado en el lugar en que se encuentra sin trasladarlo a otro lugar. Este proceso se realiza en suelos excavados con la finalidad de degradar un elevado número de contaminantes químicos, generalmente de carácter orgánico: fitosanitarios agrícolas, petróleo y sus derivados, aceites y ciertos compuestos orgánicos halogenados, pero también se puede utilizar en descontaminación de metales pesados. En el proceso denominado biorremediación *ex situ* el material contaminado se traslada a otro lugar para realizar o completar su descontaminación (Gómez, 2004).

El término biorremediación fue acuñado a principios de la década de los '80 y proviene del concepto de "*remediación*". Los científicos determinaron que era posible aplicar estrategias de remediación que fuesen biológicas, basadas esencialmente en la observación de la capacidad de los microorganismos de degradar en forma natural ciertos compuestos contaminantes. Entonces, la biorremediación surge como una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el uso de seres vivos (microorganismos y plantas) capaces de degradar compuestos que provocan desequilibrio en el medio ambiente, ya sea suelo, sedimento, fango o mar (Levitus y col., 2004).

2.2.1.1. Tipos de biorremediación

2.2.1.1.1. Degradación enzimática

Este tipo de degradación consiste en el empleo de enzimas en el lugar contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas. Estas enzimas se



obtienen en fermentadores a partir de microorganismos nativos o modificados genéticamente. Por ejemplo, existe un amplio número de industrias de procesamiento de alimentos que producen residuos que necesariamente deben ser tratados antes de ser eliminados. En estos casos, se aplican grupos de enzimas que hidrolizan polímeros complejos para luego terminar de degradarlos con el uso de microorganismos. Estas enzimas son utilizadas en tratamientos en los cuales los microorganismos no pueden desarrollarse debido a la alta toxicidad de los contaminantes. Por ejemplo, se emplea la enzima peroxidasa para iniciar la degradación de fenoles y aminas aromáticas presentes en aguas residuales de muchas industrias (Levitus y col., 2004).

2.2.1.1.2. Biorremediación microbiana

En este tipo de remediación se usan microorganismos en el lugar de la contaminación. Los microorganismos utilizados en biorremediación pueden ser los existentes (autóctonos) en el sitio contaminado o pueden provenir de otros ecosistemas, en cuyo caso deben ser agregados o inoculados. La descontaminación se produce debido a la capacidad natural que tienen ciertos organismos de transformar moléculas orgánicas en sustancias más pequeñas, que resultan menos tóxicas. El hombre ha aprendido a aprovechar estos procesos metabólicos de los microorganismos. De esta forma, los microorganismos, mediante el proceso de biorremediación pueden degradar compuestos tóxicos hasta convertirlos en compuestos inocuos o menos tóxicos, reduciéndose de esta forma, la polución de los sistemas acuáticos y terrestres. La gran diversidad de microorganismos existentes ofrece muchos recursos para limpiar el medio ambiente y en la actualidad, esta área está siendo objeto de intensa investigación. Existen, por ejemplo, bacterias y hongos que pueden degradar con relativa facilidad petróleo y sus derivados, benceno, tolueno, acetona, pesticidas, herbicidas, éteres, alcoholes simples, entre otros. Los

metales pesados como uranio, cadmio y mercurio no son biodegradables, pero las bacterias pueden concentrarlos de tal manera que éstos son eliminados más fácilmente. Las actividades microbianas en el proceso de biorremediación se pueden resumir en el siguiente esquema (Levitus y col., 2004).

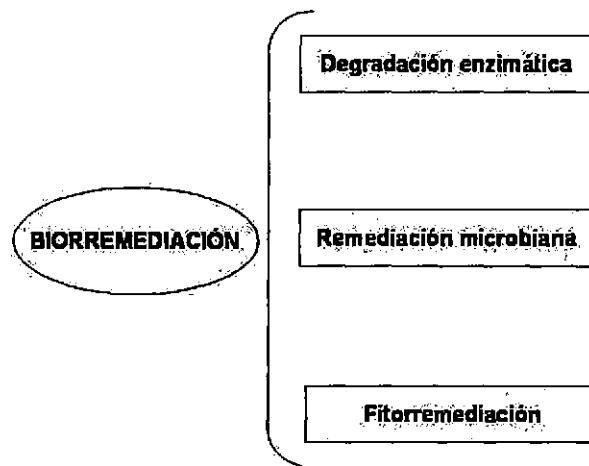


Figura Nº 1: Tipos de biorremediación (Levitus y col., 2004).

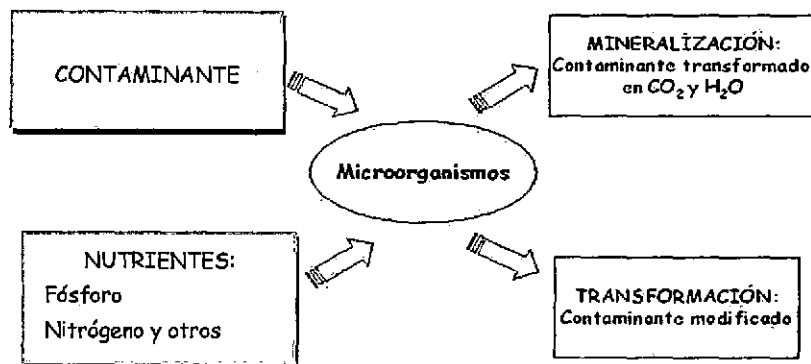


Figura Nº 2: Metabolismo microbiano (Levitus y col., 2004).

2.2.1.1.3. Fitorremediación

La fitorremediación es un proceso en el que se utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y sedimentos, los que pueden ser aplicados tanto *in situ* como *ex situ*. Los mecanismos de la fitorremediación incluyen la rizodegradación, la fitoextracción, la fitodegradación y la fitoestabilización (Volke y Velasco, 2002).

La rizodegradación se lleva a cabo en el suelo que rodea a las raíces. Las sustancias excretadas naturalmente por éstas, suministran nutrientes para los microorganismos, mejorando así su actividad biológica. Durante la fitoextracción, los contaminantes son captados por las raíces (fitoacumulación) y posteriormente éstos son traslocados y/o acumulados hacia los tallos y hojas (fitoextracción). En la fitoestabilización, las plantas limitan movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo, debido a la producción en las raíces de compuestos químicos que pueden adsorber y/o formar complejos con los contaminantes, inmovilizándolos así en la interface raíces-suelo. La biodegradación consiste en el metabolismo de contaminantes dentro de los tejidos de la planta, a través de enzimas que catalizan su degradación (Volke y Velasco, 2002).

La fitorremediación puede aplicarse eficientemente para tratar suelos contaminados con compuestos orgánicos como benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX); solventes clorados; hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP); desechos de nitrotolueno; agroquímicos clorados y organofosforados; además de compuestos inorgánicos como Cd, Cr(VI), Co, Cu, Pb, Ni, Se y Zn. Se ha demostrado también su eficiencia en la remoción de metales radioactivos y tóxicos de suelos y agua (Volke y Velasco, 2002).

Existen varias limitaciones que deben considerarse para su aplicación: (i) el tipo de plantas utilizadas determina la profundidad de los suelos a descontaminar; (ii) altas concentraciones de contaminantes pueden resultar tóxicos para su desarrollo; (iii) depende del ciclo agrícola; (iv) no es efectiva para contaminantes fuertemente sorbidos; (v) la toxicidad y biodisponibilidad de los productos de la degradación no siempre se conocen y pueden mobilizarse o bioacumularse en animales (Volke y Velasco, 2002).

2.2.2. Bacterias degradadoras de hidrocarburos

La biodegradación mediante bacterias ofrece grandes posibilidades de limpiar y descontaminar sistemas complejos y gracias a sus ventajas económicas y ambientales será una de las tecnologías más desarrolladas durante este siglo. Se están utilizando cepas especializadas de microorganismos de alta actividad para tratar agentes contaminantes en diferentes sectores, como las industrias que utilizan catalizadores, las textiles, las curtiembres, el procesamiento de celulosa y almidón, la galvanoplastia, la minería, el desengrasado y recubrimiento de superficies y la impresión (Levitus y col., 2004).

El desarrollo biotecnológico que se está llevando a cabo para procesos de biorremediación se pueden mencionar a los siguientes:

- Bacterias transgénicas que son capaces de degradar compuestos tóxicos en compuestos menos nocivos.
- Bacterias capaces de reducir las formas altamente tóxicas de mercurio en otras menos tóxicas y volátiles.
- Bacterias que transforman metales del suelo en formas menos tóxicas o insolubles. Por ejemplo, la reducción de cromo (Cr^{+6} a Cr^{+3}).
- La utilización de la bacteria *Deinococcus radiodurans* para eliminación de elementos radiactivos presentes en el suelo y aguas subterráneas.

- Cianobacterias a las que se le han introducido genes de bacterias *Pseudomonas* con capacidad de degradar diferentes hidrocarburos o pesticidas (Levitus y col., 2004).

Tabla N° 01: Principales microorganismos que degradan petróleo y sus derivados (Murria, R., 2009)

MICROORGANISMO	COMPUESTO DEGRADABLE
<i>Acinetobacter sp.</i>	n-alcanos
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hidrocarburos saturados y aromáticos
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	c, petróleo crudo
<i>Achromobacter sp.</i>	Bifenilos policlorados
<i>Arthrobacter sp.</i>	Hidrocarburos saturados y aromáticos
<i>Alcaligenes sp.</i>	Petróleo crudo
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Fenol
<i>Bacillus lentus</i>	Bifenilos policlorados
<i>Bacillus mascerans</i>	Bifenilos policlorados
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bifenilos policlorados
<i>Beauveria alba</i>	Hidrocarburos saturados y aromáticos
<i>Candida tropicalis</i>	Petróleo crudo
<i>Celulomonas flavigena</i>	Petróleo crudo
<i>Comamonas acidovorans</i>	Bifenilos policlorados
<i>Desifitobacterium dehalogenans</i>	O-Clorofenol
<i>Desulfococcus sp.</i>	Alquibencenos
<i>Flavobacterium devirans</i>	Bifenilos policlorados
<i>Gordina sp.</i>	Dibenzotiofeno
<i>Marinobacter aquaelolei</i>	Petróleo crudo
<i>Micrococcus sp.</i>	Petróleo crudo
<i>Microcoleus sp.</i>	Pireno
<i>Micobacterium chthonoplastes</i>	n-Alcanos
<i>Micobacterium sp.</i>	Pireno, n-alcanos
<i>Nocardia sp.</i>	Dibenzotiofeno
<i>Nocardiopsis sp.</i>	Petróleo crudo
<i>Paerubacillum sp.</i>	Dibenzotiofeno
<i>Phormidium corium</i>	n-Alcanos
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Hidrocarburos saturados y aromáticos
<i>Pleorotus ostreatus</i>	Polinucleo aromáticos
<i>Pseudomonas sp.</i>	Tolueno, bifenilos policlorados, fenantreno
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	Fenol
<i>Pseudomonas fluoresces</i>	Petróleo crudo
<i>Pseudomonas putida</i>	Petróleo crudo
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Tetracloroetileno
<i>Rhizobium meliloti</i>	Dibenzotiofeno
<i>Rhodococcus sp.</i>	Dibenzotiofeno
<i>Rhodococcus sp.</i>	Alcanos
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Petróleo crudo
<i>Saccharomyces sp.</i>	Petróleo crudo
<i>Serratia sp.</i>	Fenol
<i>Serratia marcescens</i>	Petróleo crudo
<i>Serratia paucimobilis</i>	HPAs
<i>Sphingomonas sp.</i>	Carbazol
<i>Sphingomonas spiritivorum</i>	Hidrocarburos saturados y aromáticos
<i>Thauera aromatica</i>	Fenol

2.2.2.1. Fundamento bioquímico de la biodegradación de hidrocarburos por microorganismos

El fundamento bioquímico se basa en que la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, realiza una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburoados) que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia (Madigan y col., 1998).

Los aceptores de finales de electrones más comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones anaerobias, este proceso es lento y es realizado por bacterias sulfato reductoras y desnitrificantes (Madigan y col., 1998).

2.2.2.2. Degradación de hidrocarburos alifáticos en presencia de oxígeno

Los hidrocarburos alifáticos se clasifican en alcanos, alquenos y alquinos dependiendo de lo saturado que estén sus enlaces. Como norma general se dice que cuanto más insaturado sea una cadena carbonatada (más dobles y triples enlaces) más difícil o lenta será su degradación. De igual manera los alcanos de cadena larga son más resistentes a la biodegradación (Rittmann y col., 2001).

Los hidrocarburos, al alcanzar un peso molecular superior a 500 dejan de servir como fuente de carbono para el crecimiento microbiano. En general también la presencia de ramificaciones reduce la tasa de biodegradación porque los átomos de carbono terciario y cuaternario interfieren con los mecanismos de degradación o lo bloquean totalmente. Los microorganismos que utilizan

hidrocarburos como sustrato deben producir enzimas (monooxigenasas) que son dependientes de oxígeno. La mayoría de los microorganismos en teoría, si son capaces de sobrevivir en ese ambiente, pueden degradar sin más problemas hidrocarburos de cadena larga. Para que los microorganismos puedan degradar alcanos primero deben oxidar el último carbono de la molécula gracias al complejo multienzimático que no hacen más que incorporar esta molécula de oxígeno. Así se obtiene un hidrocarburo con un grupo alcohol siendo así una molécula más reactiva. Mediante otras enzimas este grupo alcohol se oxida hasta grupo aldeído y finalmente carboxílico. Así se obtiene una molécula similar a un ácido graso y puede ser degradado a acetil-CoA por oxidación. Este proceso de oxidación también puede darse en carbonos no terminales dando lugar a dos ácidos grasos que se procesarán por oxidación (Madigan y col., 2004).

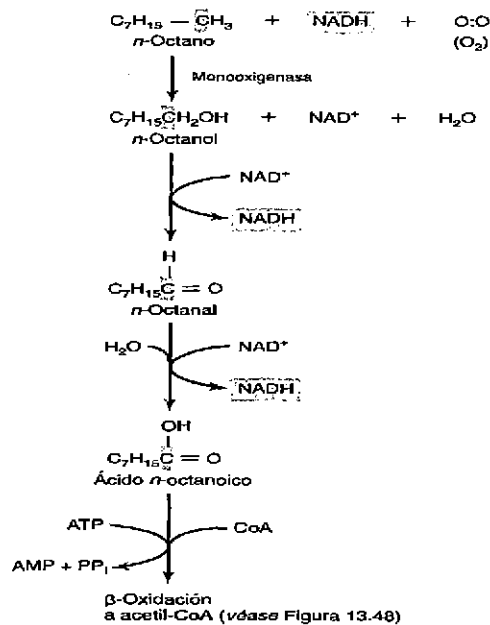


Figura N° 3: Etapas en la oxidación de un hidrocarburo alifático, la primera de las cuales es catalizada por una monooxigenasa (Madigan y col., 2004)

2.2.3. Aceites lubricantes

Son aceites grasos o aceites de origen mineral que se aplican a las superficies de rodadura, deslizamiento o contacto de las máquinas para reducir el rozamiento entre las partes móviles. Los lubricantes naturales pueden ser fluidos o semifluidos (como los aceites orgánicos y minerales), semisólidos, como la grasa o sólidos como el grafito. Entre los lubricantes sintéticos están las siliconas y otros productos especiales capaces de soportar temperaturas muy altas, como las propias de los motores diesel avanzados. Estos productos pueden tomar la forma de recubrimientos que permiten a las partes móviles lubricarse por sí solas o de aceites que se descomponen sin dejar sedimentos generadores de rozamiento (Encarta, 2009).

Los primeros lubricantes fueron los aceites vegetales y las grasas animales. Sin embargo, desde finales del siglo XIX más del 90% de todos los lubricantes se derivan del petróleo o del aceite de esquistos, productos abundantes que pueden destilarse y condensarse sin descomponerse (Encarta, 2009).

Los aceites lubricantes derivados del petróleo, son obtenidos por procesos de destilación, produciéndose gas húmedo, gasolina, turbosina, kerosene, diesel, etc. del residuo se obtiene los aceites básicos, los que son enviados a las plantas de vacío en las que se extraen los aceites básicos crudos más ligeros. De ese lugar, sale un residuo que es enviado a las plantas desasfaltadoras, en las que se producen los aceites básicos más pesados, obteniéndose también un subproducto para la elaboración de los asfaltos. Una vez obtenida toda la gama de aceites básicos crudos, se envían a las plantas de extracción con furfural, en las que son desaromatizados, incrementándose su índice de viscosidad y mejorándose el color, entre otras cosas. Posteriormente, pasan a otro tratamiento en una planta de hidrotatamiento, la cual funge como estabilizadora, quitando compuestos de azufre, nitrógeno, oxígeno, etc. (Quiminet, 2009).

En general los aceites lubricantes automotrices, dependiendo el uso al que se destinan, como por ejemplo; usados en motor a diesel o gasolina, transmisión manual o automática, sistema de la dirección, etc., así como la viscosidad que se requiere y las especificaciones que deban cumplir, son el resultado de la mezclas de dos o más aceites básicos y además se adicionan diferentes tipos de aditivos para mejorar algunas propiedades de los aceites (Quiminet, 2009).

La elaboración de aceites lubricantes, se inicia cuando los aceites básicos son transportados a los tanques de almacenamiento de la planta, dependiendo la viscosidad que se necesita obtener, se transfieren a un tanque o tina de mezclado, en el que se adicionan los aditivos, que pueden ser (a) antidesgaste; (b) detergentes y/o (c) dispersantes (Quiminet, 2009).

El tanque de mezclado, generalmente tiene un sistema de calentamiento y agitación para realizar una mezcla homogénea del producto. Una vez realizada la mezcla, se procede a realizar los controles de acuerdo a las normas de cada país. Luego de tener la conformidad de los resultados el aceite se envía a los tanques de producto terminado para posteriormente proceder a su venta, a granel, o envasado (Quiminet, 2009).

2.3. Marco conceptual

2.3.1. Suelos contaminados con aceite lubricante usado

Se denomina a suelos contaminados con aceite residual tóxico, que no ha sido dispuesto adecuadamente y es desechado al suelo, en forma casual o intencionalmente, ocasionando de este modo un deterioro en el ambiente y la salud humana, por sus efectos cancerígenos, tóxicos y venenosos, por ser considerados sustancias de difícil biodegradación y estar clasificados como residuos peligrosos por la reglamentación establecida en el Convenio de Basilea (Acuña y col., 2008).

2.3.2. Biodegradación

La biodegradación de hidrocarburos y sus derivados es un proceso mediante el cual, los microorganismos reducen la complejidad de los compuestos químicos a compuestos más simples, es decir de menor peso molecular; por lo que se presenta como una opción muy viable para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos y sus derivados.

Para que la degradación se lleve a cabo, es necesario que existan las condiciones ambientales adecuadas, así como la cantidad suficiente de microorganismos degradadores de hidrocarburos, estos por lo general son microorganismos autóctonos del sitio contaminado. En caso de que las condiciones ambientales y los microorganismos degradadores no sean suficientes, es necesario establecerlas (Acuña y col., 2008).

2.3.3. Porcentaje de germinación

La germinación es el potencial o poder que tiene la semilla para producir plantas. Siendo este elemento fácil de medir. La prueba de germinación es un bioensayo que permite determinar la capacidad que tiene la semilla para producir plantas (Cárdenas y col., 2004).

2.3.4. Optimización de condiciones de crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano se ve afectado por las condiciones ambientales a las que están expuestos y también por las diversas concentraciones de nutrientes. No todos los microorganismos responden igualmente a un determinado factor ambiental o a una concentración de nutrientes, por lo que es necesario establecer condiciones ambientales y concentración de nutrientes en las que los microorganismos puedan tener un mejor desarrollo y crecimiento (Madigan y col., 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preliminares para la Investigación

Para llevar a cabo la investigación, se realizó el muestreo, de los diferentes talleres automotrices, establecimientos de expendio de aceites lubricantes así como los grifos que se ubican en la ciudad de Ayacucho. Para el análisis de los resultados de las pruebas de bioensayos se usó la prueba de Tukey y análisis de regresión. Para la optimización de parámetros de crecimiento para el Consorcio Microbiano Uno, se usó de diseño factorial AxB de las variables independientes; concentración de nitrato de amonio (0,5; 1,0 y 1,5 g/L), concentración de aceite lubricante usado (2, 4 y 8 %), temperaturas (25, 30 y 35 °C) y pH (6, 7 y 8) y superficie de respuestas. Todos los ensayos efectuados se realizaron con tres repeticiones.

2. Obtención de muestras

- a. Se tomaron muestras de suelos contaminados con hidrocarburos y sus derivados, en tres zonas de la ciudad de Ayacucho. Estas zonas congregan la mayor densidad de talleres de reparación de motores y cambio de aceite, a las que se designaron como; zona 1 (talleres y centros de expendio de aceite lubricante aledaños a la avenida Libertadores), zona 2 (talleres y

centros de expendio de aceite lubricante en el distrito Jesús de Nazareno) y zona 3 (talleres y centros de expendio de aceite lubricante aledaños a la avenida Cusco). Ver planos en anexos.

- b. Se ubicaron las áreas contaminadas con hidrocarburos, luego se procedió a delimitar el área en 50 cm² de forma aleatoria, para luego realizar el muestreo.
- c. Se limpió la superficie de tierra a una profundidad de 1 cm, posteriormente con ayuda de una espátula desinfectada con alcohol, se tomó las muestras de suelo hasta una profundidad aproximada de 3 cm.
- d. La muestra estuvo constituida por 1000 g de tierra la que fue colocada en una bolsa de polietileno y se rotuló con los siguientes datos: número, lugar y fecha de muestreo. Luego se transportó al laboratorio de Biotecnología de la UNSCH para el procesamiento respectivo.

3. Procesamiento de muestras

- a. Se tamizó la muestra con una malla de 2x2 mm de luz para separar las piedras y grumos.
- b. Se pesó 20 g de suelo tamizado y se colocó en 4 frascos conteniendo 200 ml de caldo Bushnell Haas (BHB) (Difco, 1984) a los que se añadió 2, 4, 8 y 16 % (v/v) de "aceite lubricante usado", respectivamente. Se consideró testigo, caldo BHB al que se añadió sólo "aceite lubricante usado", con la finalidad de evaluar la transformación del contaminante por la influencia diferente a la microbiana.
- c. Se incubó en un equipo de agitación horizontal por 14 días a temperatura ambiente.

4. Aislamiento de microorganismos

- a. Al cabo de 14 días se observó la formación de película y turbidez, en la superficie de los medios de cultivo en agitación, que evidenció crecimiento microbiano.
- b. Se aislaron los microorganismos por el método de agotamiento en superficie sobre medios de cultivo sintéticos: agar papa dextrosa, agar nutritivo y agar Bushnell Haas a este último se adicionó 10 gotas de "aceite lubricante usado" en la superficie de la placa. Posteriormente, las placas se incubaron en una estufa a 25 °C, al cabo de 5 días se observó la formación de colonias.
- c. El conjunto de colonias aisladas de los diferentes sectores fueron consideradas como consorcios microbianos y se inocularon juntas en caldo Bushnell Haas, adicionando "aceite lubricante usado" a una concentración de 8% (v/v), hasta el día 14 en el que se observó crecimiento en forma de película.

5. Degradación del aceite lubricante usado en suelos esterilizados

- a. Se esterilizó suelos obtenidos de campo de cultivo, previo tamizaje con malla 2x2 mm de luz.
- b. El suelo se distribuyó en recipientes de plástico, a razón de 600 g en cada recipiente y se añadió el "aceite lubricante usado" a concentraciones de 2, 4, 8 y 16 % (v/m), por triplicado, para cada concentración.
- c. Se inoculó 5% (v/m) del consorcio microbiano desarrollado en caldo Bushnell Haas, luego se homogenizó el suelo cada dos días, así mismo se mantuvo la humedad entre 28 a 30 % (v/m) para lo cual se utilizó caldo Bushnell Haas estéril, por dos meses.

- d. De forma paralela se instaló suelos experimentales testigo, a los que se añadió "aceite lubricante usado", en concentraciones de 2, 4, 8 y 16 % (v/m), a los que no se inoculó microorganismos.
- e. También se trabajó con suelos experimentales denominados "blanco", a los que no se añadió "aceite lubricante usado", ni microorganismos.

6. Bioensayos

Se usaron semillas de "col rizada" *Brassica oleracea* y "raigrás" *Lolium perenne* proporcionadas por Instituto Nacional de innovación Agraria (INIA).

- a. Se usaron recipientes de plástico, en los que se colocó papel filtro humedecido con agua estéril en la base y luego se añadió 100 g de suelo obtenido en el ítem 5.
- b. Se colocaron diez semillas de "col rizada" *Brassica oleracea* y "raigrás" *Lolium perenne* en cada recipiente, esparcidas unas de otras, por toda la superficie, se introdujo a 3 mm de la superficie y se luego se procedió a etiquetar los recipientes, cada ensayo con tres repeticiones.
- c. Se realizó la observación diaria para controlar y ajustar la humedad del suelo.
- d. El décimo primer día se realizó el recuento de las semillas germinadas y se midió la longitud de las plántulas desarrolladas.
- e. Este procedimiento se repitió para los suelos con las diferentes concentraciones de "aceite lubricante usado", además se trabajó los suelos denominados blanco y testigo, realizándose por triplicado.

7. Optimización de parámetros para la degradación del aceite lubricante usando microorganismos del Consorcio Uno a diferentes concentraciones de nitrógeno, temperatura, pH, concentración de “aceite lubricante usado”

La degradación del “aceite lubricante usado” por las cepas microbianas se determinó en el tiempo en el cual los microorganismos usan el “aceite lubricante usado” como fuente de carbono y energía, el “aceite lubricante usado” al ser degradado por los microorganismos produce compuestos reducidos. Para lo cual se utilizó el reactivo diclorofenol-2,6-indofenol (DCPIP) que es un colorante redox, que en su forma oxidada es de color azul y en su forma reducida es incolora.

7.1. Preparación del inóculo

- a. Se reactivaron cada una de las seis cepas de microorganismos degradadores del “aceite lubricante usado” considerado en el consorcio con mejor capacidad degradativa, cuatro levaduras y dos bacterias. A las levaduras se les sembró usando asa de Kolle en agar Papa Dextrosa y a las bacterias en agar Nutritivo.
- b. Se incubaron a 25°C por 72 horas.
- c. Se resuspendió cada una de las seis cepas en SSF comparando la turbidez con el tubo Nº 2 del Nefelómetro de Mc Farland.
- d. Luego se mezclaron las seis cepas, a razón de 5 ml cada una, en un matraz estéril de 125 ml.

7.2. Prueba multipozos para la evaluación cualitativa de degradación de “aceite lubricante usado”.

- a. En una bandeja, acondicionada para la prueba multipozos se distribuyó vasos descartables nuevos, desinfectados con alcohol al 70% usando hisopos, con una capacidad de 5 ml cada uno y se cubrió todos los vasos con una lámina de vidrio.
- b. En cada vaso se colocó 2,50 ml de caldo Bushnell Haas, el cual fue preparado a diferentes pH (6, 7 y 8) y con diferentes concentraciones de nitrato de amonio (0,5; 1,0 y 1,5 g/100 ml).
- c. En cada vaso se colocó 150 μ L de DCPIP.
- d. Se añadió “aceite lubricante usado” a concentraciones de 2, 4, 8 % v/v, respectivamente, luego se añadió 400 μ L de inóculo de los microorganismos del consorcio microbiano.
- e. Se consideró dos testigos.
- f. A uno de los testigos se colocó, 2,50 ml de caldo Bushnell Haas, se añadió 150 μ L de DCPIP + 2, 4, 8 % de “aceite lubricante usado”, respectivamente, sin añadir microorganismos del consorcio.
- g. Al otro testigo se colocó 2,50 ml del caldo Bushnell Haas, se añadió 150 μ L de DCPIP, sin “aceite lubricante usado”, ni microorganismos del consorcio microbiano.
- h. Se cubrió con una lámina de vidrio y luego las bandejas se colocaron en estufa a temperaturas de 25, 30 y 35 °C. Se colocó agua destilada estéril en la base de la incubadora, con la finalidad de proveer humedad.
- i. Se realizaron observaciones a las 24, 48, 72 y 96 horas para verificar la desaparición del color azul, característico de DCPIP, que indica la degradación del “aceite lubricante usado”.

8. Identificación de cepas degradadoras de “aceite lubricante usado”

8.1. Reactivación de las cepas

- a. Se reactivó cada una de las seis cepas degradadoras de “aceite lubricante usado”; agar Nutritivo en caso de bacterias, agar Papa Dextrosa en caso de levaduras.
- b. Se verificó su pureza, mediante coloraciones diferenciales.

8.2. Pruebas para identificación

8.2.1. Bacterias

- a. Se realizó la coloración de Gram.
- b. Luego se realizó las pruebas bioquímicas para *Bacillus cereus* y otros *Bacillus sp.* según el esquema propuesto por la FDA (2012).

8.2.2. Levaduras

- a. Se observó las características microscópicas, mediante coloración simple.
- b. Se realizaron pruebas bioquímicas para su identificación. Según manual de procedimiento del Instituto Nacional de Salud (Guevara, 2007).

IV. RESULTADOS

Tabla N° 02: Identificación Bioquímica de los microorganismos degradadores de "aceite lubricante usado" del Consorcio Microbiano Uno.

ÓRDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	<i>Bacillus sp.</i>
Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	<i>Bacillus sp.</i>
Sporodiales	Sporidiobolaceae	Rhodotorula	<i>Rhodotorula sp</i>
Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Candida	<i>Candida glabrata</i>
Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Candida	<i>Candida krusei</i>
Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Candida	<i>Candida sp.</i>

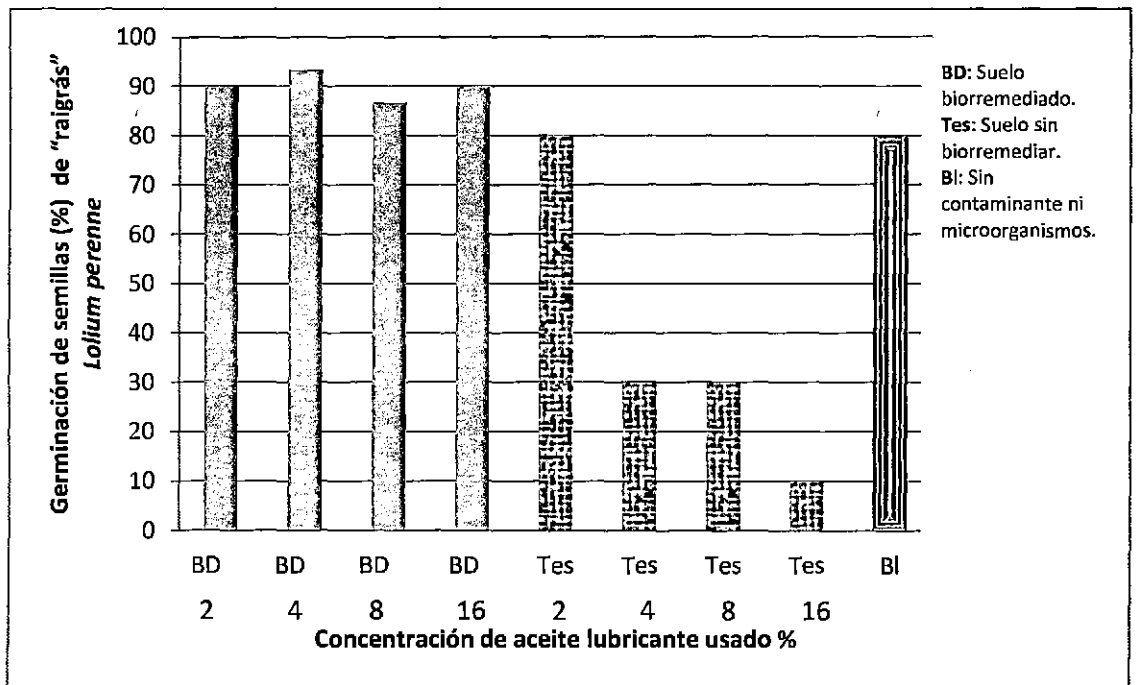


Figura N° 4: Porcentaje promedio de germinación de semillas de "raigrás" *Lolium perenne* en suelo biorremediado por el Consorcio Microbiano Uno, a los 7 días.

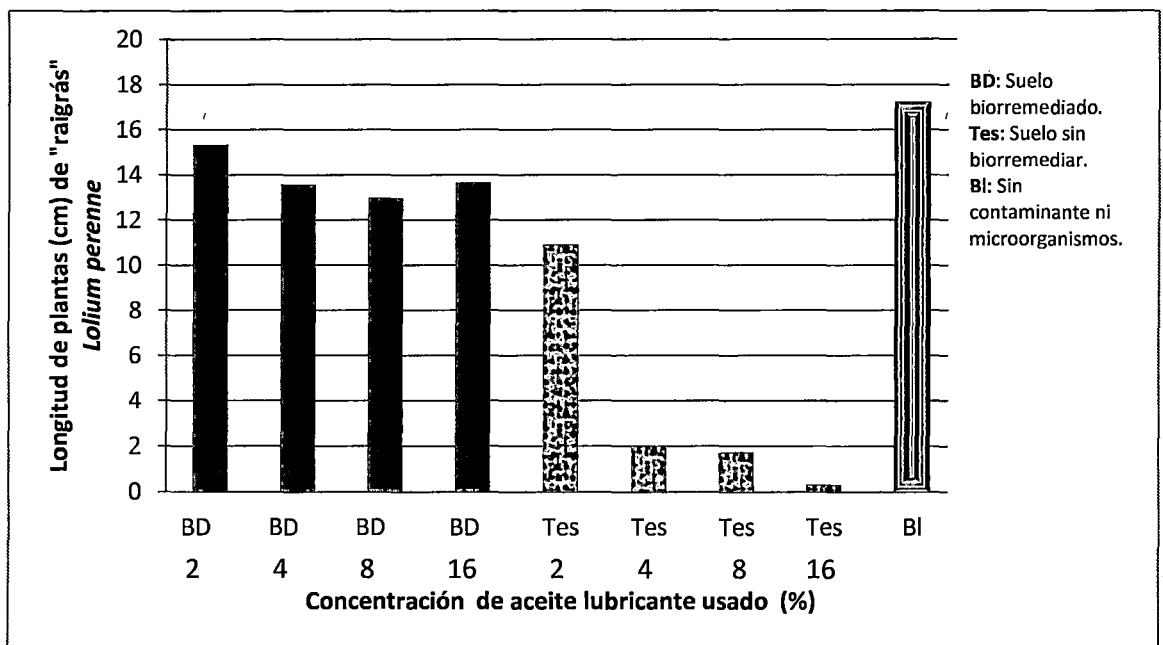


Figura N° 5: Longitud de plantas de "raigrás" *Lolium perenne* desarrolladas en suelo biorremediado por el Consorcio Microbiano Uno, a los 7 días.

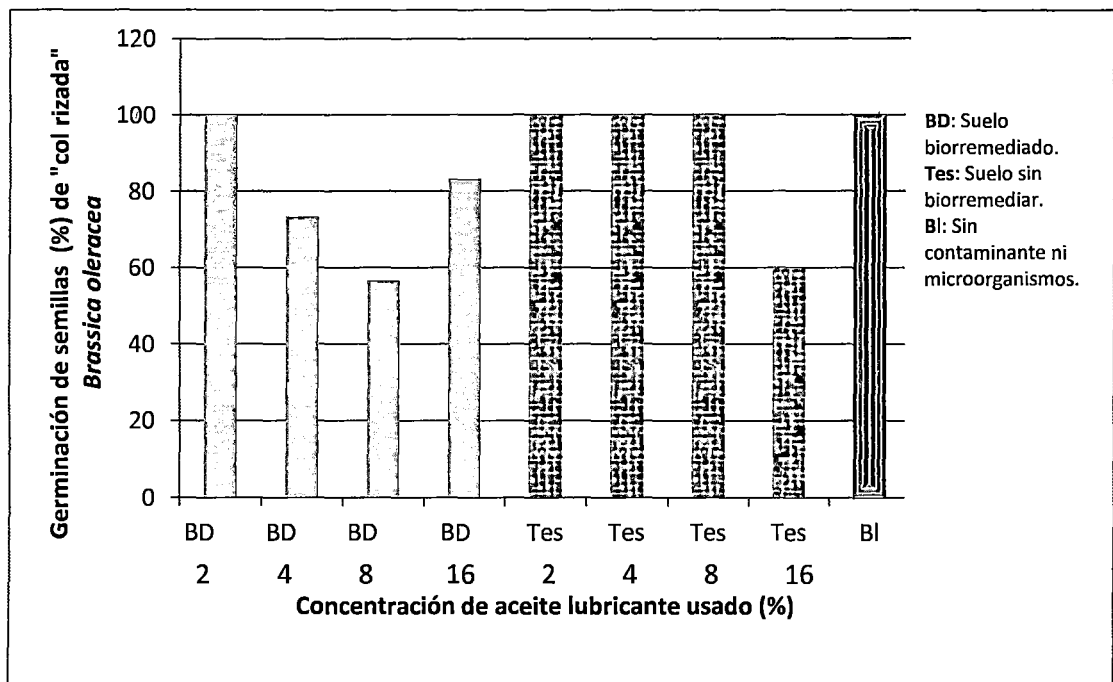


Figura N° 6: Porcentaje promedio de germinación de semillas de “col rizada” *Brassica oleracea* en suelo biorremediado por el Consorcio Microbiano Uno, a los 7 días.

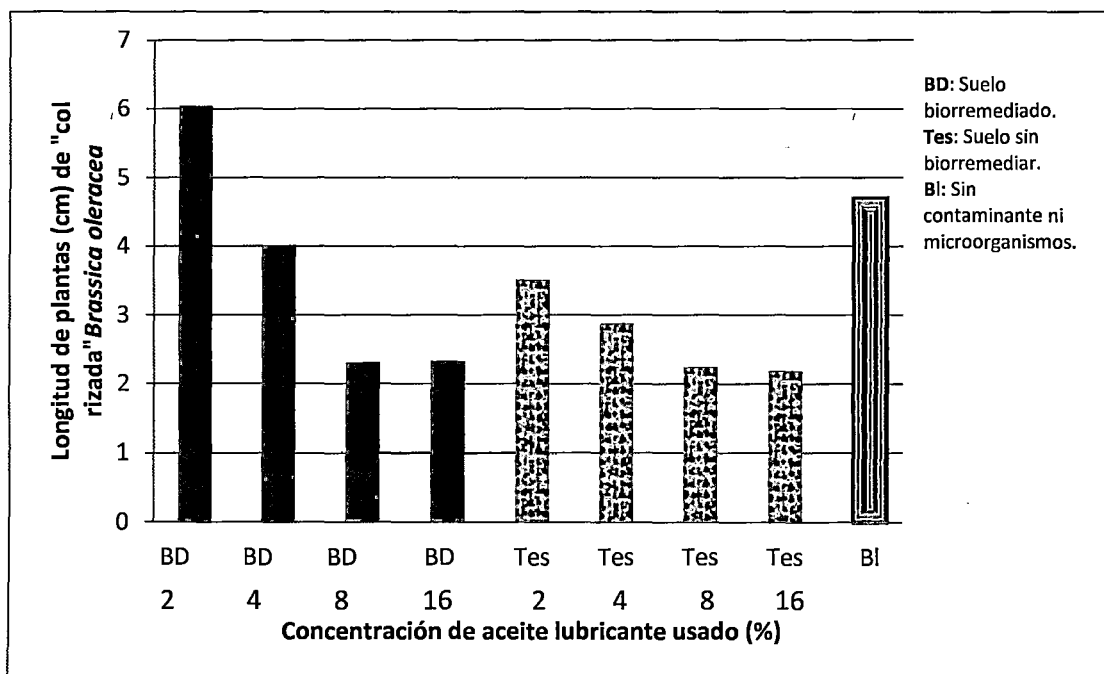


Figura N° 7: Longitud de plantas de "col rizada" *Brassica oleracea* desarrolladas en suelo biorremediado por el Consorcio Microbiano Uno, a los 7 días.

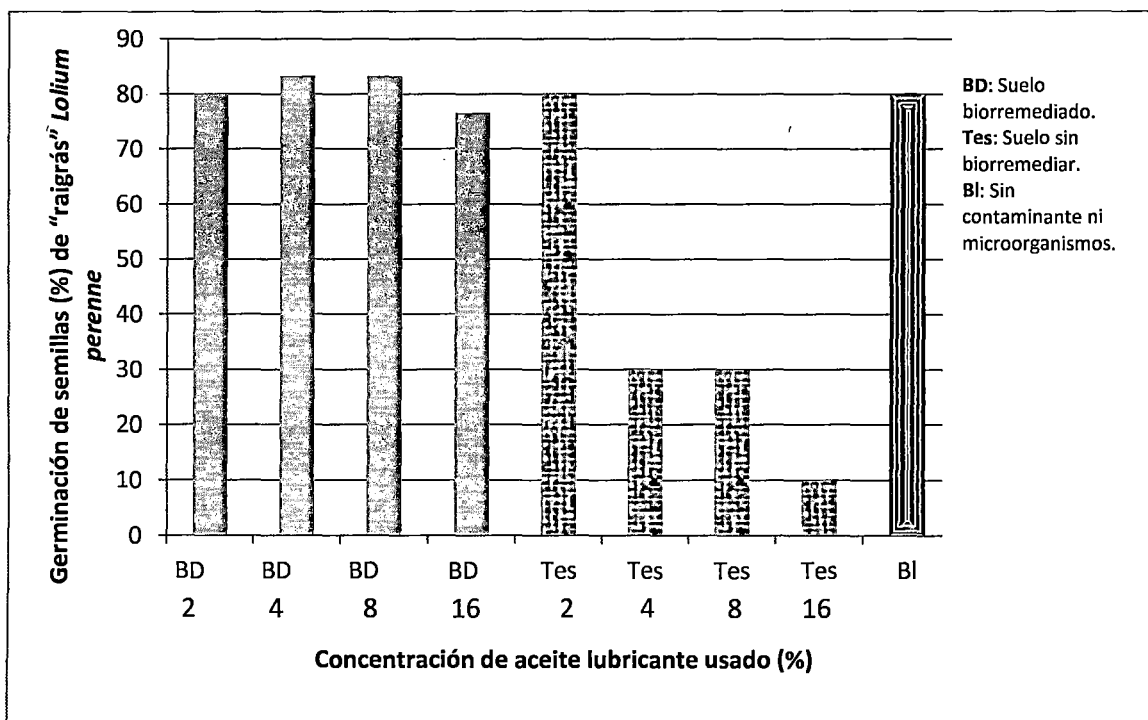


Figura N° 8: Porcentaje promedio de germinación de semillas de "raigrás" *Lolium perenne* en suelo biorremediado por el Consorcio Microbiano Dos, a los 7 días.

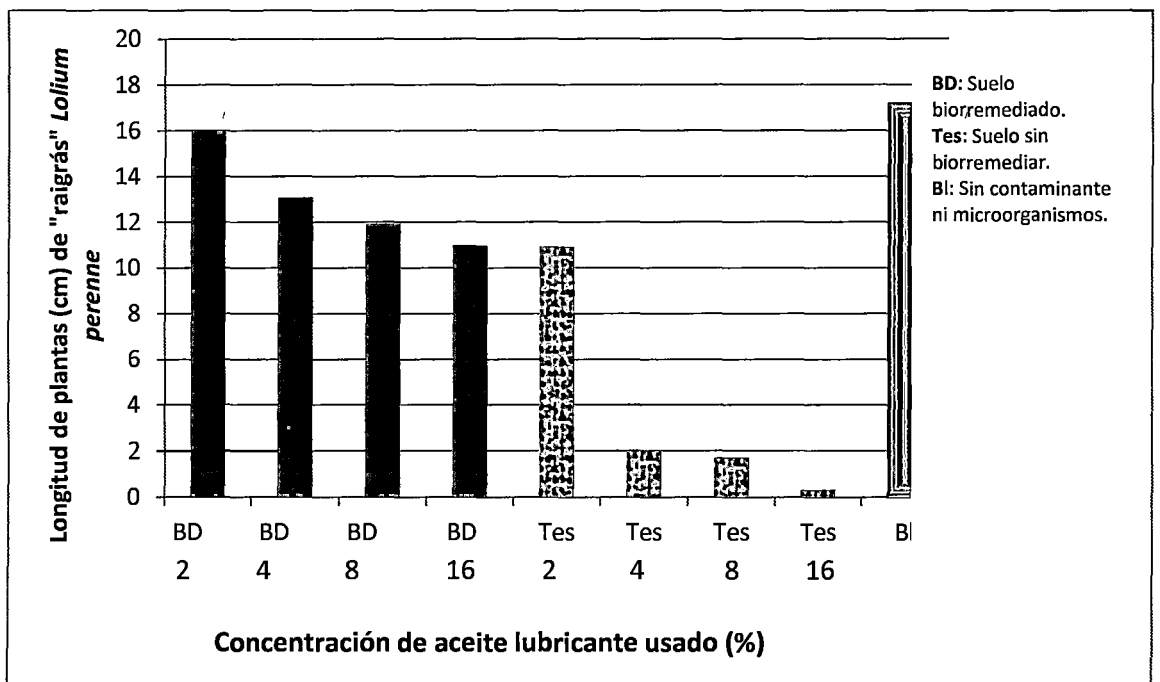


Figura N° 9 Longitud de plantas de "raigrás" *Lolium perenne* desarrolladas en suelo biorremediado por el Consorcio Microbiano Dos, a los 7 días.

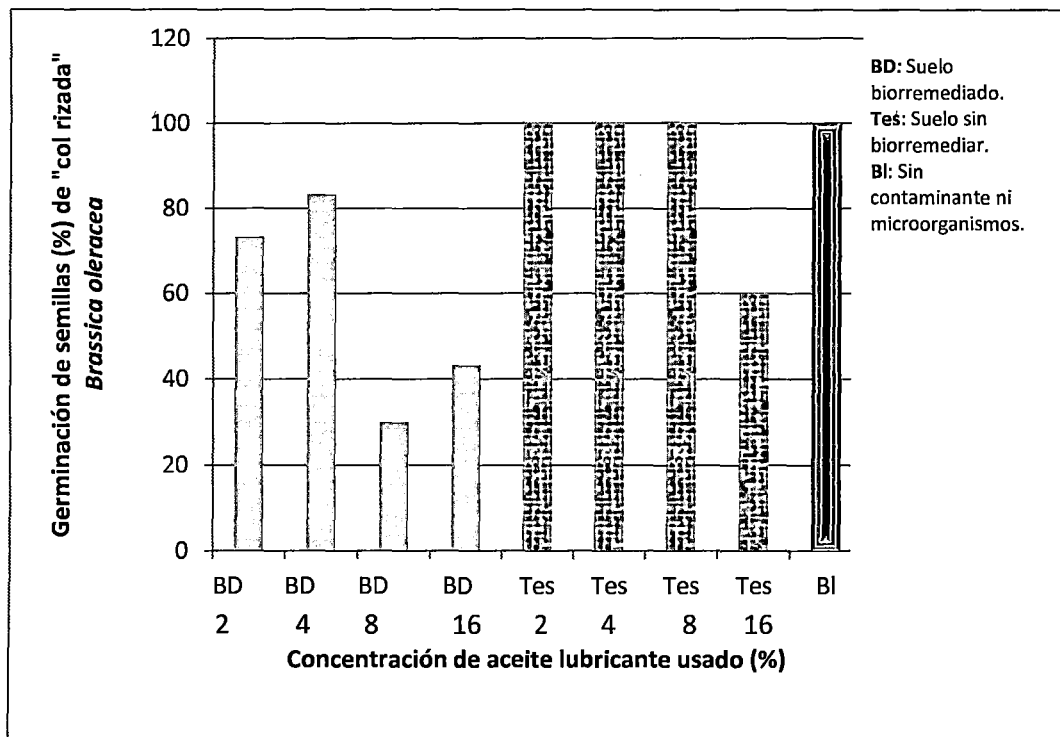


Figura N° 10 Porcentaje promedio de germinación de semillas de “col rizada” *Brassica oleracea* en suelo biorremediado por el Consorcio Microbiano Dos, a los 7 días.

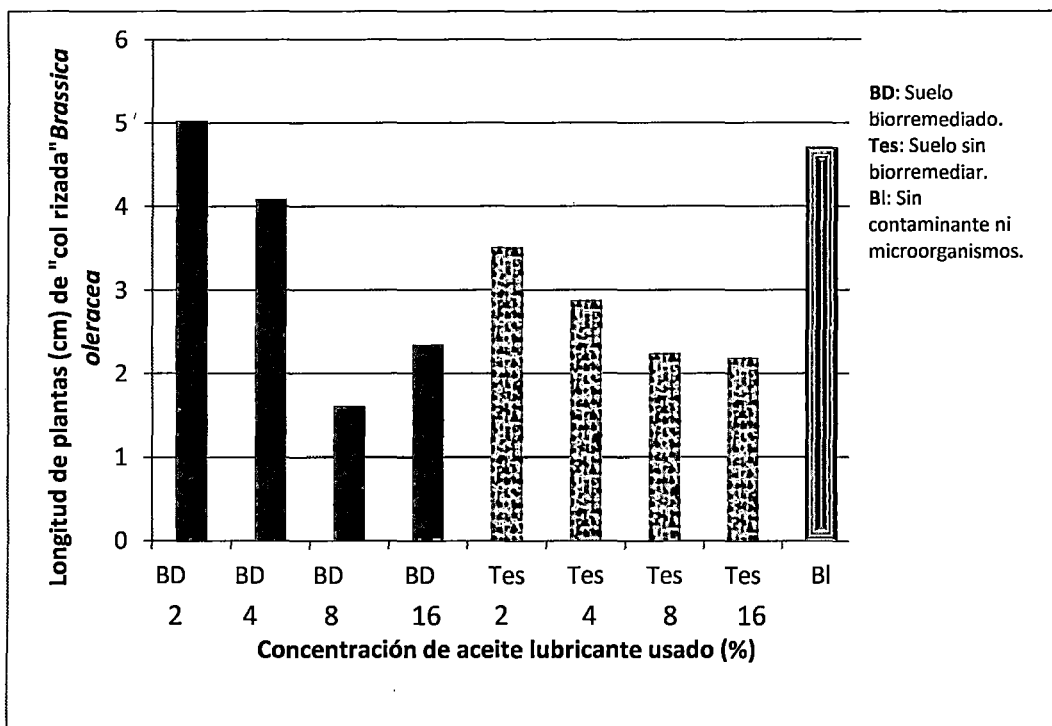


Figura N° 11: Longitud de plantas de “col rizada” *Brassica oleracea* desarrolladas en suelo biorremediado por el Consorcio Microbiano Dos, a los 7 días.

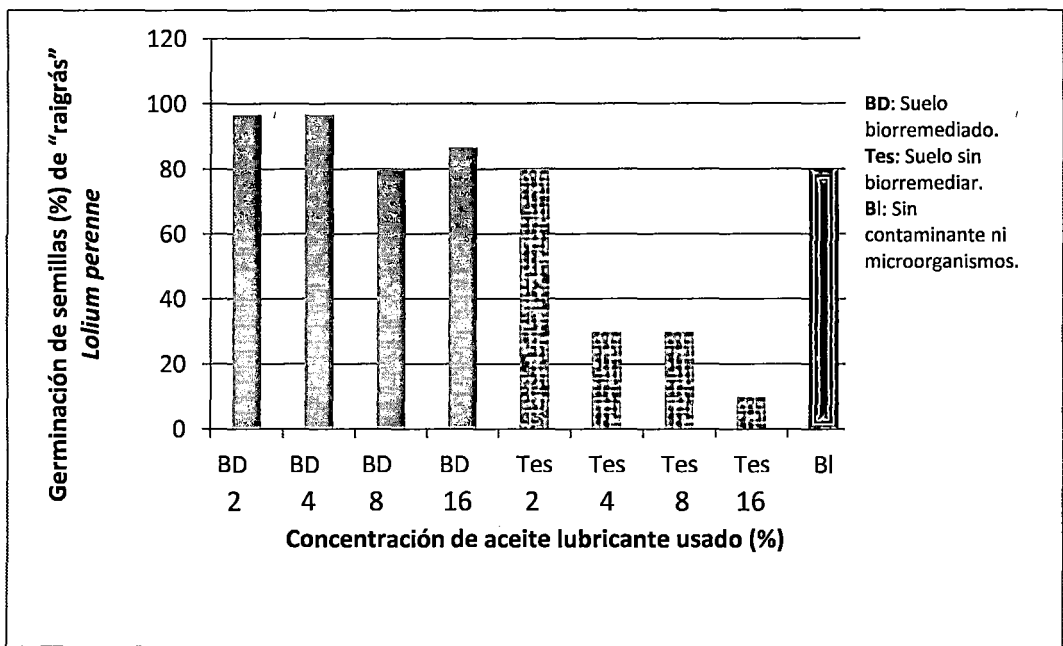


Figura N° 12: Porcentaje promedio de germinación de semillas de "raigrás" *Lolium perenne* en suelo biorremediado por el Consorcio Microbiano Tres, a los 7 días.

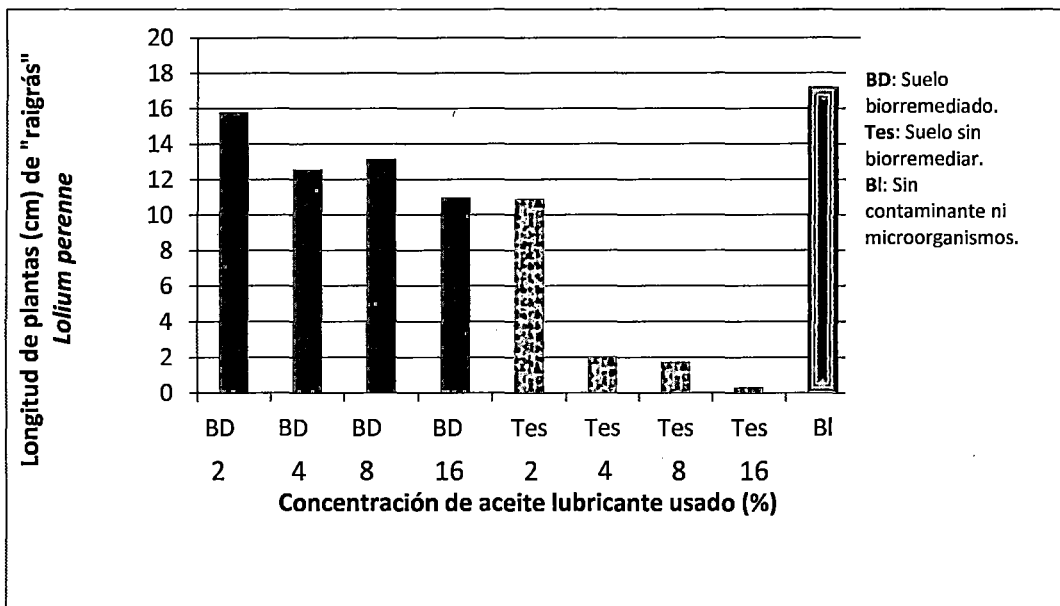


Figura N° 13: Longitud de plantas de "raigrás" *Lolium perenne* desarrolladas en suelo biorremediado por el Consorcio Microbiano Tres, a los 7 días.

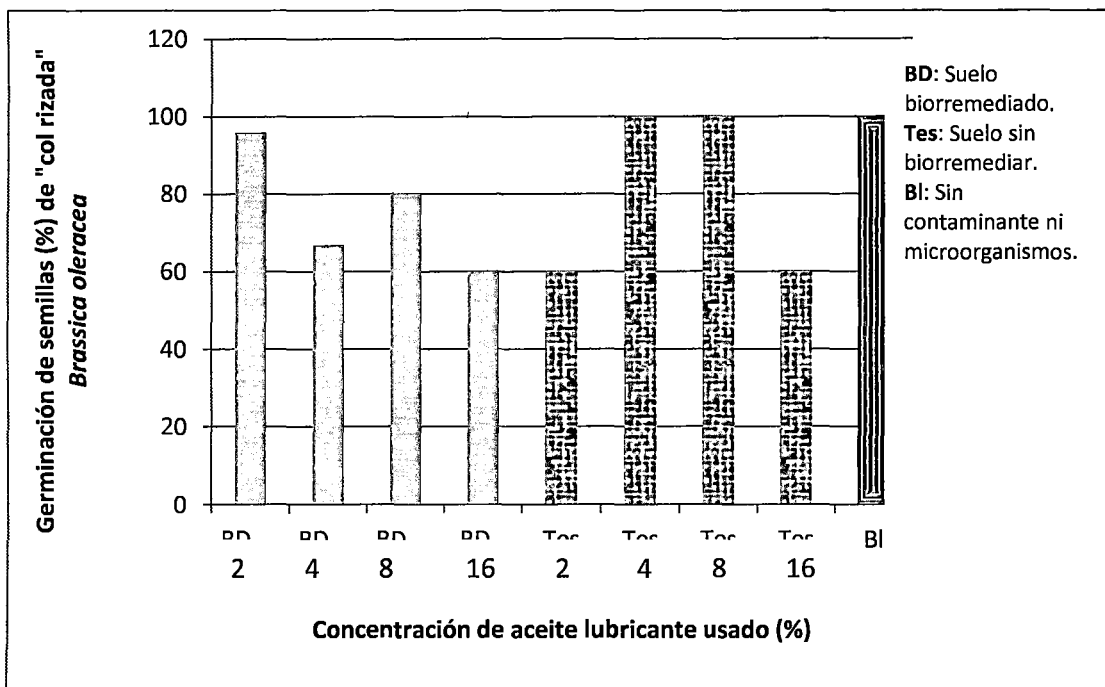


Figura N° 14: Porcentaje promedio de germinación de semillas de "col rizada" *Brassica oleracea* en suelo biorremediado por el Consorcio Microbiano Tres, a los 7 días.

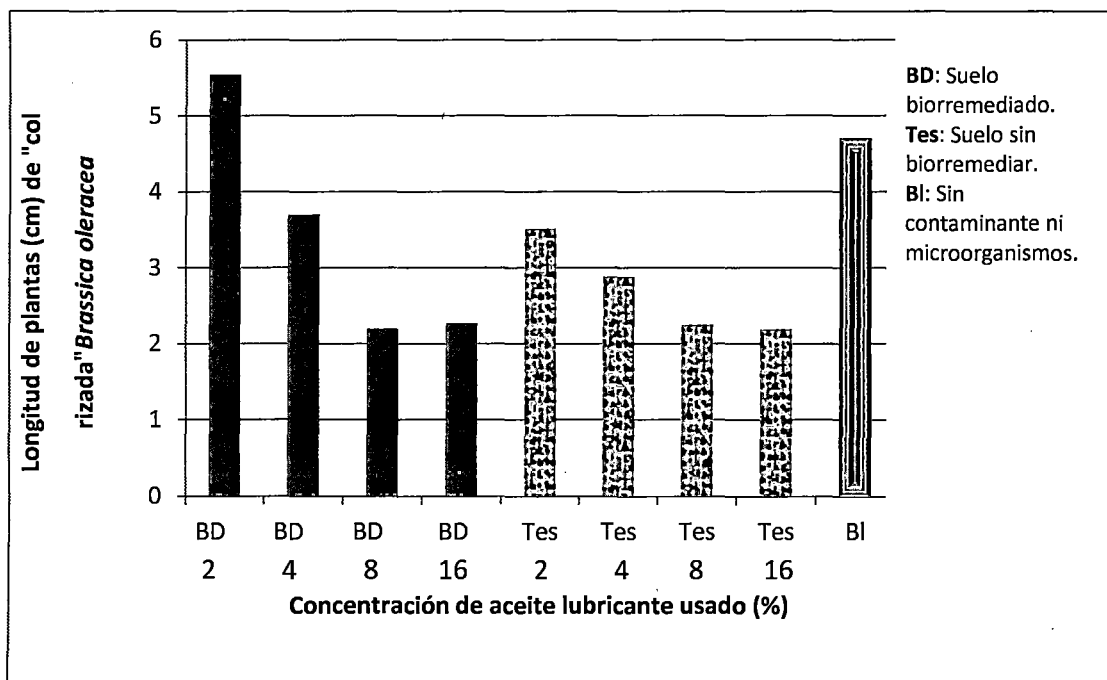


Figura N° 15: Porcentaje de germinación de semillas de "col rizada" *Brassica oleracea* en suelo biorremediado por el Consorcio Microbiano Tres, a los 7 días.

Tabla N° 3: Resultados de la Prueba de Tukey en los tratamientos (microorganismos Vs. concentración de "aceite lubricante usado"), con "raigrás" *Lolium perenne* como fitoindicador.

Micro organismo	Sin	Sin	Sin	Sin	Con	Con	Con	Con
Aceite Lubricante	16%	8%	4%	2%	16%	8%	4%	2%
Tamaño de plántula (\bar{x})	2.79	4.7	5.37	10.94	11.89	12.7	13.09	15.71
		●————●			●————●		●————●	
	E							
		D	D					
					C	C	C	
						B	B	B
								A

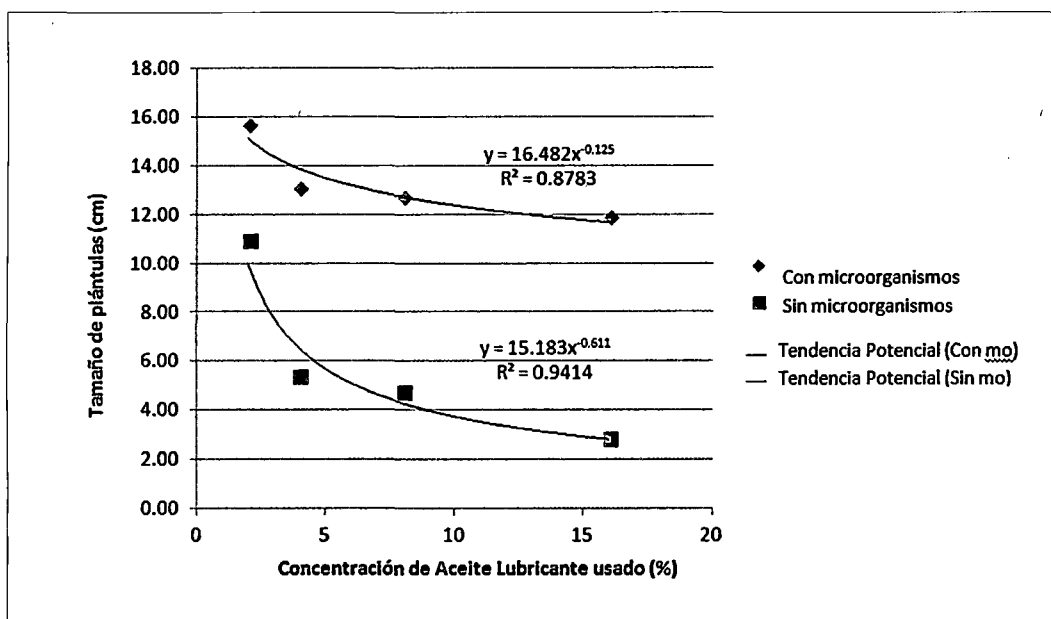


Figura N° 16: Tendencia del crecimiento de "raigrás" *Lolium perenne* cuando se desarrolla en suelos biorremediados, usando microorganismos degradadores de "aceite lubricante usado" y en suelos sin biorremediar.

Tabla N° 4: Resultados de la prueba de Tukey en los tratamientos (microorganismos Vs. concentración de “aceite lubricante usado”), con “col rizada” *Brassica oleracea* como fitoindicador.

Micro organismo	Sin	Sin	Sin	Sin	Con	Con	Con	Con
Aceite Lubricante	16%	8%	4%	2%	16%	8%	4%	2%
Tamaño de plántula (\bar{x})	2.79	4.7	5.37	10.94	11.89	12.7	13.09	15.71
		●————●			●————●		●————●	
	E							
		D	D					
					C	C	C	
						B	B	B
								A

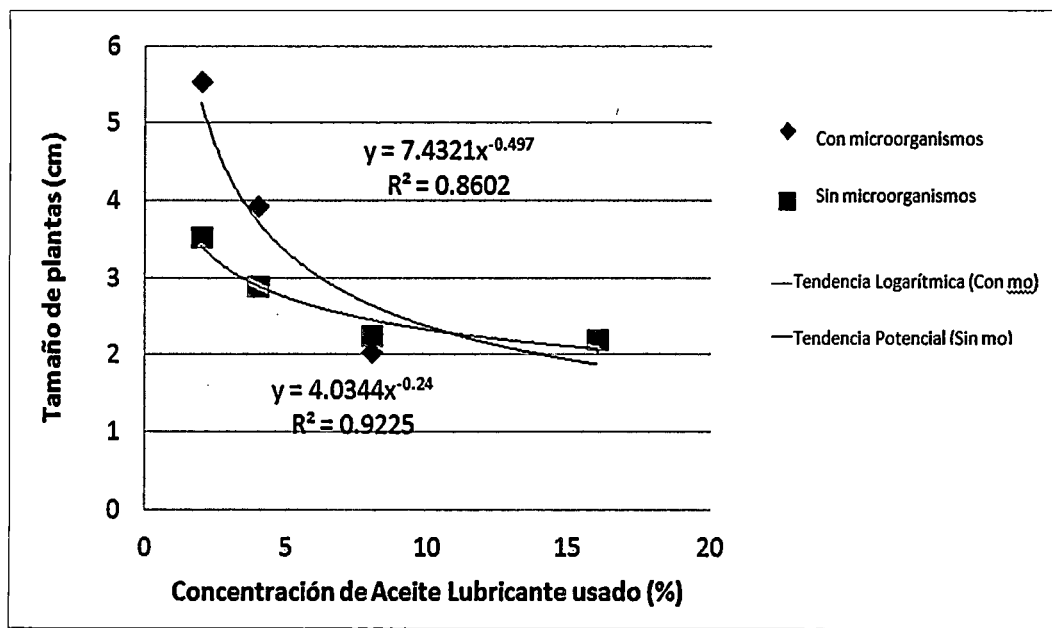


Figura N° 17: Tendencia del crecimiento de “col rizada” *Brassica oleracea* al crecer en suelos biorremediados usando microorganismos biorremediadores y en suelos sin biorremediar.

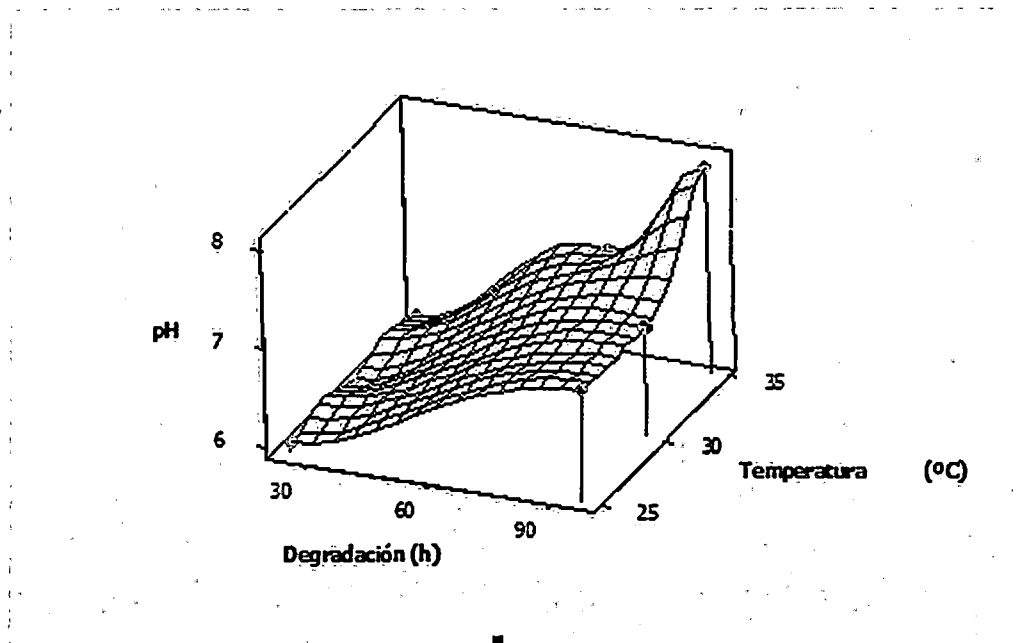


Figura N° 18: Superficie de respuesta de las interacciones de temperatura, pH versus la degradación de "aceite lubricante usado", en búsqueda de optimizar el desarrollo del Consorcio Microbiano Uno.

V. DISCUSIÓN

En la Tabla N° 2; se reporta la identificación bioquímica de los microorganismos que constituyen el Consorcio Microbiano Uno, siendo los siguientes; *Bacillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida sp.*

En las investigaciones sobre biorremediación reportan, en algunos casos, la identificación de los microorganismos partícipes de los consorcios de microorganismos, por ejemplo:

Pardo y col. (2004) al realizar la investigación sobre el efecto de adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo en Bogotá Colombia, identificaron a una cepa de *Corynebacterium propinquum* y dos cepas de *Bacillus brevis*. Coincidiendo con nuestro trabajo de investigación en el que se identificó a dos cepas del género *Bacillus sp.*

Bracho y col. (2004), al estudiar la degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado de Zulia, Venezuela, de los resultados se conoce que aislaron un total de 37 cepas bacterianas; *Pseudomonas* (54.05%), *Bacillus* (24.32 %), *Staphylococcus* (16.21%), *Micrococcus* (5.40%). En nuestro trabajo de investigación, se aislaron

un total de seis cepas de las cuales dos cepas fueron identificadas como *Bacillus sp* y las otras cuatro fueron levaduras.

Vallejo y col. (2005), al realizar la evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) en suelos contaminados, en Bogotá Colombia, identificaron 6 especies de microorganismos degradadores de hidrocarburos; *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter iwoffii*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas putida*, *Chromobacterium violaceum*, *Flavimonas oryzihabitans*. Los microorganismos identificados en Bogotá, no fueron los mismos en nuestro trabajo de investigación, probablemente debido a las diferencias de las condiciones del hábitat de Bogotá con Ayacucho y a las diferentes formas como se adaptan los microorganismos involucrados en la degradación de hidrocarburos y sus derivados.

Castro y col. (2008), al realizar la remoción de fenantreno por *Azolla caroliniana* utilizando bioaumentación por microorganismos hidrocarbonoclastas usó un consorcio degradador de hidrocarburos compuesto por *Bacillus stearothermophilus* y *Oscillatoria sp*. Los microorganismos del género *Bacillus sp.*, son reportados con frecuencia en los trabajos de biorremediación de sustancias contaminantes, las tenemos para remoción de fenantreno así como en nuestro trabajo de investigación biodegradando “aceite lubricante usado”.

Gómez y col. (2004), al realizar la determinación de la capacidad de degradación de compuestos orgánicos persistentes por bacterias marinas aisladas de sedimentos en el Caribe Colombiano, aislaron los microorganismos *Acinetobacter sp*, *Brevibacillus agri* y *Pseudomonas sp.*, en sedimentos contaminados con plaguicidas organofosforados y a los microorganismos; *Bacillus pumilus*, *Enterobacteriaceae bacterium*, *Klebsiella pneumoniae*,

Pseudomonas sp. y *Ralstonia sp.*, en suelos contaminados con hidrocarburos. A diferencia de nuestros resultados, en los que se identificó cuatro especies de levaduras y dos bacterias.

Martínez y col. (2005), al realizar estudios sobre los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo, en Barcelona, España, mencionan la presencia de cianobacterias, bacterias fototróficas, bacterias heterotróficas, bacterias reductoras del sulfato y el género *Marinobacter*. En nuestro trabajo de investigación a diferencia de lo encontrado por Gómez y col. (2004) y Martínez y col. (2005), se encontró bacterias pertenecientes a dos géneros de *Bacillus sp.* en suelos contaminados con hidrocarburos.

En las figuras N° 4, 8 y 12 observamos que las semillas de "raigrás" *Lolium perenne*, tuvieron un promedio de germinación de 87%, cuando se desarrollaron en suelos biorremediados por los tres consorcios microbianos, aislados de suelos contaminados con hidrocarburos. Mientras, que las semillas que se desarrollaron en suelos contaminados *in vitro*, donde no hubo biorremediación microbiana del "aceite lubricante usado", la germinación promedio fue de 38%. Así mismo, en las figuras N° 5, 9 y 13 observamos que las plantas de "raigrás" *Lolium perenne*, tuvieron un desarrollo promedio de 13,3 cm, en suelos biorremediados por los tres consorcios microbianos, aislados de suelos contaminados con hidrocarburos, mientras que las plantas que desarrollaron en suelos contaminados *in vitro* con "aceite lubricante usado", sin biorremediar alcanzaron un desarrollo promedio de 4 cm.

En las figuras N° 6, 10 y 14 la germinación de semillas de "col rizada" *Brassica oleracea* fue de 70 % en promedio, cuando se desarrollaron en suelos biorremediados por los tres consorcios de microorganismos aislados de suelos

contaminados con hidrocarburos, sin embargo se observa que en el suelo testigo, considerado a aquel en el que no se usaron consorcios microbianos para biorremediar el “aceite lubricante usado”, se observó 90 % de germinación en promedio de la misma semilla. Se puede inferir que las semillas de “col rizada” *Brassica oleracea*, tienen un mejor desarrollo en la etapa embrionaria, en suelos biorremediados. En las figuras N° 7, 11 y 15, en los que se observa la longitud alcanzada por las plantas de “col rizada” *Brassica oleracea*, en promedio de 3,3 cm en suelos biorremediados por los tres consorcios microbianos aislados de suelos contaminados con hidrocarburos, en comparación a los 3 cm de desarrollo mostrado por la “col rizada” *Brassica oleracea* en suelos testigo o suelos sin biorremediar.

En la tabla N° 3 se estableció la comparación del tamaño de las plantas, usando la prueba de Tukey, para los tratamientos: microorganismos Vs. concentración de “aceite lubricante usado” a concentraciones de 2, 4, 8 y 16 %, frente al crecimiento de plantas de “raigrás” *Lolium perenne*, como variable dependiente. El mayor desarrollo de las plantas se observó en los suelos que fueron biorremediados con los tres consorcios microbianos, cuando la contaminación con “aceite lubricante usado” fue de 2 %, seguido de los suelos donde la concentración de aceite lubricante usado fue de 4% mientras que, cuando se utilizó suelos biodegradados con “aceite lubricante usado” en concentraciones de 8 y 16%, éstas fueron iguales estadísticamente. El desarrollo de las plantas de “raigrás” *Lolium perenne* en suelos en los que no se usaron consorcios de microorganismos degradadores, no permitió el desarrollo adecuado de las plantas, siendo el suelo con “aceite lubricante usado” a 16%, el que tuvo el mayor efecto negativo en el desarrollo de las plantas.

La figura N° 16, se presenta las curvas como resultado del ajuste, de las variables: concentración de “aceite lubricante usado” como contaminante y el desarrollo de “raigrás” *Lolium perenne*, en dos condiciones: suelos biorremediados y suelos sin biorremediar. Observándose en ambos casos la tendencia de la curva potencial.

En la tabla N° 4, se utiliza la prueba de Tukey, para la evaluación de la longitud de plántulas de “col rizada” *Brassica oleracea* cuando el suelo contaminado *in vitro* con “aceite lubricante usado” fue biorremediado por los tres consorcios de microorganismos aislados de suelos contaminados con hidrocarburos, el desarrollo observado fue mayor en los suelos contaminados con 2% seguido de 4% de “aceite lubricante usado”. Mientras que las plántulas que se desarrollaron en suelos contaminados donde las concentraciones de “aceite lubricante usado” fue 8 y 16% el desarrollo del fitoindicador se considera menor estadísticamente en comparación a las plántulas que desarrollaron en suelos en los que el “aceite lubricante usado” no fue biodegradado por el consorcio de microorganismos.

La figura 17, es el resultado de la proyección de la concentración de “aceite lubricante usado” y el desarrollo de “col rizada” *Brassica oleracea*, cuando se desarrolla en suelos con presencia de consorcios de microorganismos que degradan al contaminante y cuando se usa suelos donde los consorcios de microorganismos degradadores no están presentes. En el primero de los casos la tendencia de la curva es logarítmica y en el segundo la tendencia es potencial. Luego de analizar mediante la prueba de Tukey la actividad de los tres Consorcios Microbianos, frente al desarrollo de las especies de “raigrás” *Lolium perenne* y “col rizada” *Brassica oleracea* no se determinaron diferencias significativas entre la actividad de los tres consorcios, por lo que se usó el Consorcio Microbiano Uno cuya media es mayor numéricamente, para realizar la

determinación de los parámetros óptimos que permitan un mayor crecimiento. La figura 18, es el resultado de la correlación que se establece entre las variables independientes y la variable respuesta en búsqueda de los parámetros para optimizar el crecimiento del Consorcio Microbiano Uno con la finalidad de degradar "aceite lubricante usado", las variables independientes fueron las siguientes; concentración de nitrato de amonio (0,5; 1,0 y 1.5 g/L), concentración de aceite lubricante usado (2, 4 y 8 %), temperaturas (25, 30 y 35 °C) y pH (6, 7 y 8). La variable respuesta se consideró el tiempo de degradación del "aceite lubricante usado". Al realizar el análisis estadístico de los resultados con sus respectivas interacciones se llegó a la determinación que el pH y la temperatura son los parámetros más influyentes en la degradación del "aceite lubricante usado", los otros dos parámetros (concentración de nitrato de amonio y concentración de "aceite lubricante usado") no tienen influencia importante en el crecimiento y actividad del Consorcio Microbiano Uno. La influencia de la temperatura y pH frente a la degradación de "aceite lubricante usado", nos da el siguiente resultado; a pH 6 y a la temperatura de 35 °C la degradación del "aceite lubricante usado" se realizó en un tiempo de 24 horas. A pH 8 y a temperatura de 35 °C el "aceite lubricante usado" fue degradado a las 96 horas. Se han reportado trabajos de investigación relacionados con la degradación de contaminantes hidrocarbonados, por microorganismos, tal es así que tenemos que; Cárdenas y col. (2004), evaluaron la influencia de la fertilización en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando lodos residuales estabilizados, en el estado de Zulia, Venezuela, en condiciones de laboratorio con diferentes tratamientos con respecto a las proporciones de lodo y fertilizante indicando que obtuvieron una remoción de hidrocarburos desde 14,64% hasta 62,68%. Las fracciones de hidrocarburos presentaron una transformación parcial de resinas en aromáticos, una degradación parcial de

asfaltenos y la degradación casi total de saturados. Lo que se encontró en la presente investigación corrobora el resultado encontrado por Cárdenas y col. (2004), pues ellos trabajaron con lodos, en los que se encuentran presentes los microorganismos degradadores de hidrocarburos, en nuestro trabajo de investigación se aislaron microorganismos de suelos contaminados con capacidad de degradar el contaminante, logrando de este modo la remoción del "aceite lubricante usado".

Lucas y col. (2005), realizaron la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando bacterias antárticas psicrotolerantes, en Argentina, trabajaron a nivel de laboratorio usando frascos, adaptando condiciones al de la Antártida, obteniendo remoción del contaminante en un 35%, sin embargo este porcentaje se incrementó cuando se inoculó microorganismos en cultivo joven autóctonos, logrando la remoción del contaminante en 81,1%. En el presente trabajo de investigación, se utilizaron microorganismos autóctonos, por los antecedentes mencionados por Lucas y col, (2005), lo que permitió una buena remoción del contaminante en los suelos, a nivel de laboratorio, tal como podemos apreciar al comparar el desarrollo de las plantas en suelos remediados y suelos sin biorremediar.

Los trabajos que se realizan en biodegradación, nos dan resultados sobre actividad de los consorcios frente a los parámetros en estudio, así tenemos que: Fontúrbel (2004), estudió la variación en el tiempo de la biomasa bacteriana, el pH y la actividad enzimática, en suelos del municipio de San Pedro de Tiquina, Bolivia, expuestos a pequeños vertientes de hidrocarburos. Estudió muestras en época seca y en época de lluvias. La biomasa presentó un descenso hasta llegar a 0 meq C/Kg en época de seca en la muestra tratada con hidrocarburos, las muestras de época de lluvias, mostraron un comportamiento exponencial, en ambos casos. En cuanto a los resultados obtenidos para la variación del pH en el

tiempo, es importante observar que el pH se regula desde una condición inicial (significativamente diferente en una época seca que en época húmeda) hacia un rango estable de pH entre 5,50 y 5,60. Según Madigan y col. (1999) muchos de los microorganismos remediadores de hidrocarburos nativos del suelo, funcionan óptimamente a un pH cercano a 5, por lo que designa a estos grupos degradadores de hidrocarburos predominantemente acidófilos. En el presente trabajo de investigación, se determinó pH óptimo 6,0 para el desarrollo del Consorcio microbiano Uno, coincidiendo con los resultados encontrados por Fontúrbel (2004), en su trabajo de investigación en San Pedro de Tiquina y denominados por Madigan y col. (1999), como microorganismos acidófilos.

Vallejo y col. (2005), al realizar la evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPHs) en suelos contaminados con petróleo, en Bogotá Colombia, analizaron el pH del suelo en estudio que fue inicialmente 5,5 en el estudio observaron una reducción significativa del pH al final del estudio llegó hasta pH 4,0. Se explica que pudo estar asociada a la baja capacidad amortiguadora del suelo y al metabolismo activo microbiano en presencia de TPHs y nutrientes, el fenómeno no se observó en el control abiótico.

Abril (2005), evaluó la eficiencia de prácticas de manejo de hábitat y microorganismos para degradar efluentes en una industria metalúrgica de Córdoba, Argentina. Para optimizar la actividad de organismos del agua, el suelo y la rizósfera de las plantas. En la determinación del pH del agua reporta que éste estuvo generalmente en un rango entre 8,4 y 10,9. No se estableció correlación significativa entre los valores de pH y la cantidad significativa de bacterias totales ($R^2 = 0,126$), sin embargo los recuentos bacterianos resultaron menores cuando el pH fue mayor de 10. La introducción de microorganismos seleccionados no mostró ser una práctica recomendable. Si bien se buscó que

las poblaciones estuvieran adaptadas a las condiciones de pH y fuentes de carbono de la laguna, no se obtuvo un aumento permanente de las poblaciones después de la inoculación. Los factores que más afectaron la actividad de las bacterias degradadoras nativas fueron: a) La cantidad de efluentes, que desprendió la producción de la fábrica, b) el pH, que varió según la corrección realizada en la planta de zincado y c) las condiciones ambientales. Sin embargo los resultados indicarían que una vez que el sistema llega a un punto óptimo tiene una alta capacidad de amortiguar estos factores, como lo indica la abundancia bacteriana que se mantuvo relativamente estable a lo largo de los años. En el presente trabajo de investigación, en forma similar a la conclusión a la que llega Abril (2005), sobre los factores que más afectaron la actividad de las bacterias degradadoras nativas, llegamos a determinar que las influencias más determinantes para el crecimiento del Consorcio Microbiano Uno fueron el pH y la Temperatura.

VI. CONCLUSIONES

1. Los tres Consorcios de Microorganismos, se aislaron, a partir de estratos superficiales de suelos contaminados con hidrocarburos, en el ensayo de biodegradación del "aceite lubricante usado" tuvieron diferentes comportamientos, a pesar de la no significancia estadística, se eligió el Consorcio Microbiano Uno para continuar con la investigación por la mayor tendencia de actividad degradativa del contaminante.
2. La biorremediación de suelos contaminados con "aceite lubricante usado" en condiciones *in vitro*, se efectuó durante 60 días, usando el Consorcio Microbiano Uno, evaluándose mediante bioensayos con "col rizada" *Brassica oleracea* y "raigrás" *Lolium perenne*, como fitoindicadores, logrando una germinación de 70% y 87% respectivamente.
3. Las mejores condiciones de degradación del "aceite lubricante usado" por el Consorcio Microbiano Uno fueron: pH 6 y temperatura 30°C, referente a la influencia de las diferentes concentraciones de nitrato de amonio como fuente de nitrógeno, éstas no mostraron ninguna diferencia significativa.
4. El Consorcio Microbiano Uno está conformado por: *Rhodotorula sp.*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida sp.* y dos cepas de *Bacillus sp.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acuña, A., Pucci, O. y G. Pucci (2008). Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de Patagonia Argentina. Ecosistemas 17 (2): 85-93. Mayo 2008. <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?id=548> (accesado en nov. 2011).
2. Araujo, I. Angulo, N., Cárdenas, C., Méndez, M., Morante, M y M. Machado (2004). Biorremediación de suelos con consorcio bacteriano, compostaje y fertilización. (accesado el 25/01/09) <http://revistas.luz.edu.ve/index.php/bcib/article/view/100/3338>.
3. Abril, A. (2005) Manejo de hábitat y microorganismos para degradar efluentes industriales: un estudio de caso. Microbiología Agrícola, Departamento Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Ecología Austral 15:9-16. Junio 2005. Asociación Argentina de Ecología. Córdoba, Argentina. http://www.grupoadela.org/newsite/uploads/Fuentes%20de%20energ_a%20biol_gica.pdf (accesado en nov. 2011).
4. Barzola, I. (2004). Evaluación de la capacidad biodegradadora de cepas bacterianas nativas en suelo contaminado experimentalmente con petróleo. Ayacucho. Tesis para optar el título de biólogo. UNSCH. Ayacucho.
5. Bracho, M., Díaz, L. y L. Soto. (2004) Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela. Laboratorio de Microbiología Acuática, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Venezuela. <http://www1.serbi.luz.ve/ojs-2.3.4/index.php/bcib/article/view/142/142> (accesado en nov. 2011).

6. Cárdenas, C., Araujo, I., Bohórquez, M., Gómez, K., Angulo N. y A. Gómez (2004). Influencia de la fertilización en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando lodos residuales estabilizados. Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 29, San Juan, 22-27 Ago. 2004. <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=20911&indexSearch=ID> (accesado en 27/03/2012).
7. Castro-Carrillo, L., Delagadillo, J., Ferrero-Cerrato, R. y A. Alarcón. (2008). Remoción de fenantreno por *Azolla caroliniana* utilizando bioaumentación con microorganismos hidrocarbonoclastas. *Interciencia*; Aug 2008;33,8; ProQuest Environmental Science Collection pp 591.
8. <http://search.proquest.com/science/docview/210114087/fulltextPDF/132604D26045B806C4/3?accountid=53500> (accesado en nov. 2011).
9. Difco.1984. Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology. 10^o Edition. Detroit. Michigan. USA.
10. Encarta. 2009. Diccionario. Microsoft Corporation.
11. FDA (2012). BBB - *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070492.htm> (accesado el 07/07/1012)
12. Fontúrbel, F. (2004) Uso de algunos parámetros indicadores microbiológicos y bioquímicos para la evaluación de la contaminación por hidrocarburos y la biodegradación de los mismos, en la zona del lago Titikaka (San Pedro de Tikina, Bolivia) www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726 (accesado el 26/03/1012)

13. Gamboa, R. (2004). Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos en suelos contaminados de la ciudad de Ayacucho. Tesis para optar el título de biólogo. UNSCH. Ayacucho.
14. Gómez, D. (2004). Recuperación de espacios degradados. Artes Gráficas Cuesta, S.A. Madrid. (Accesado el 31 de mayo 2012)
http://books.google.com.pe/books?id=UjwV5cfj8ToC&pg=PA228&dq=concepto++biorremediaci%C3%B3n&hl=es&sa=X&ei=ozHGT8OSO6XF0QG4_Y2SCw&ved=0CEsQ6AEwBA#v=onepage&q=concepto%20%20biorremediaci%C3%B3n&f=false
15. Gómez, M., Hurtado, C., Dussán, J., Parra, J. y S. Narváez. (2006). Determinación de la capacidad de degradación de compuestos orgánicos persistentes por bacteria marinas aisladas de sedimentos en el Caribe Colombiano. Actual Biol 28(85): 125-137. Colombia.
<http://www.oceandocs.org/handle/1834/2825> (accesado en nov. 2011).
16. Guevara, M., Urcia, F. y J. Casquero. (2007). Manual de Procedimientos y Técnicas de Laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Lima.
17. Levitus, G., Acuña, C., Ledesma, S., Parody B. y E. Poma. (2004). El cuaderno de Porque Biotecnología. En línea <http://www.PorqueBiotecnología.com.ar/educación/cuaderno/ec-26.asp> (accesado el 07/05/09)
18. Lopolito M., Molina L., Corbella M., Kabbas S, García E., Lanfranchi D., Gómez, C. y L. Higa. (2006). Biodegradación de hidrocarburos de petróleo y sustancias relacionadas. Instituto Nacional de Ciencia y Técnica Hídricas - Centro de Tecnología del Uso del Agua y el Ambiente. Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Buenos Aires, Medrano 951 - (1179) Buenos Aires. Argentina En línea.

- <http://www.ingenieroambiental.com/info/biohidro.pdf> (accesado el 27/01/09)
19. Lucas, R., Vázquez, S., Lo Balbo, A. y W. Mac Cormack. (2005). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando bacterias antárticas sicrotolerantes. <http://www.dna.gov.ar/CIENCIA/SANTAR04/CD/PDF/206BH.PDF> (accesado en nov. 2011)
 20. Madigan M. Martinko J. y J. Parker. (1998). Brock Biología de los Microorganismos. 8va Ed. Edit. Prentice Hall. España.
 21. Madigan M. Martinko J. y J. Parker. (2004). Brock Biología de los Microorganismos. 10ma. Ed. Edit. Prentice Hall. España.
 22. Marín, M. (2001). Regulación de la Degradación de Alcanos en tres Estirpes Bacterianas Aisladas de Lugares Contaminados por Petróleo. Centro Nacional de Biotecnología. Universidad Autónoma de Madrid. España. http://www.cibernetia.com/tesis_es/CIENCIAS_DE_LA_VIDA/MICROBIOLOGIA/METABOLISMO_BACTERIANO/1 (accesado 22/03/12)
 23. Martín, C., González, A. y M. Blanco (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Rev Iberoam Micol 2004; 21:103-120. España. <http://reviberoammicol.com/2004-21/103120.pdf> (descargado el 15/11/2011).
 24. Martínez-Alonso M. y N. Gaju (2005). El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. Ecosistemas 14 (2): 79-91. Mayo 2005. Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona. España. <http://revistaecosistemas.net/pdfs/122.pdf> (accesado en nov. 2011).
 25. Murria, R. 2009. Bioquímica de Harper. Editorial El Manual Moderno S.A. 14º Edición. Impreso en México.

26. Pardo, J., Perdomo, M., y J. Benavides (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. Nova, enero-diciembre, año/vol.2, Nro. 002. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. pp 40-49. Bogotá, Colombia. <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/411/41100205.pdf> (accesado en nov. 2011).
27. Quiminet. (2009). Sectores relacionados: maquinaria y equipo. Productos y servicios relacionados: mantenimiento industrial. En línea. www.e-industria.com/ar1/ar_l%25BE%250E%25E7%25DA%2583br.htm - 83k - (accesado el 07/05/09)
28. Rittmann B. y P. McCarty. (2001). Biotecnología del Medio Ambiente. Editorial McGraw Hill Interamericana. España.
29. Vallejo, V., Salgado, L. y F. Roldan (2005). Evaluación de la bioestimulación en a biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. Rev. Colomb. Vol. VII No. 2 Diciembre 2005 67-78. Colombia. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2351601> (accesado en nov. 2011).
30. Vásquez, M., Guerrero J. y A. Quintero. (2010). Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. 12, No. 1. (accesado el 26/03/2012) www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/15579
31. Volke, T. y J. Velasco (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Taller Gráfico de Jiménez Editores Impresores S.A. México. Libro en línea [www.ecopuerto.com/bicentenario/ TecnologiasRemediacion.pdf](http://www.ecopuerto.com/bicentenario/TecnologiasRemediacion.pdf) (accesado el 8/03/12)

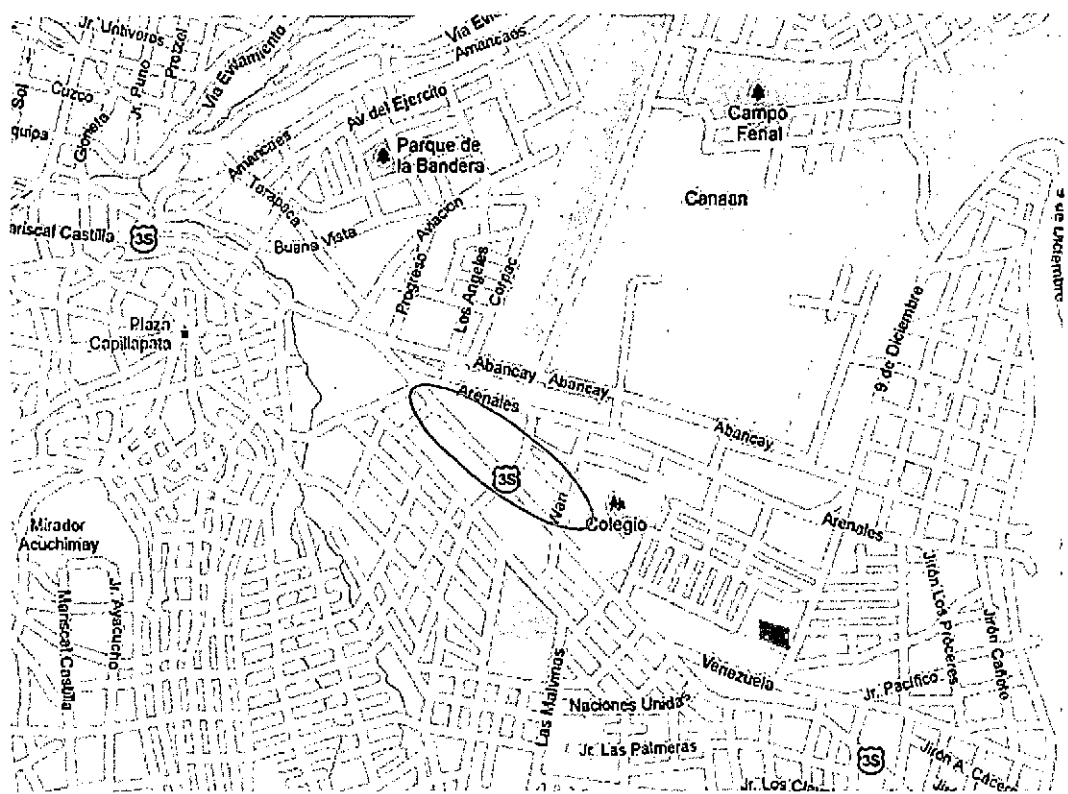


Figura N° 21: Zona 3 de los talleres y centros de expendio de aceite lubricante ubicados en las cuadras 1 al 3 de la avenida Cusco en la ciudad de Ayacucho, 2011.

Tabla N° 5: Microorganismos del Consorcio Dos, aislados de suelos contaminados con aceite lubricante usado en establecimientos de venta y reparación de motores, alrededor de las avenidas Venezuela y Los Incas. Ayacucho, 2011.

Nº	Morfología	Coloración
1	Cocobacilo	Gram +
2	Bacilo	Gram +
3	Bacilo en cadena	Gram +
4	Levadura, ovoide	Azul de Tripán

Tabla N° 6: Microorganismos del Consorcio Tres, aislados de suelos contaminados con aceite lubricante usado alrededor de establecimientos de venta y reparación de motores ubicados en las cuadras del 1 al 3 de la Av. Cusco. Ayacucho, 2011.

Nº	Morfología	Gram
1	Coco en cadena	+
2	Bacilo en cadena	-
3	Cocobacilo	-
4	Bacilo esporulado	+

Tabla N° 7: Identificación de bacterias del Consorcio Uno, aislados de suelos contaminados con aceite lubricante usado alrededor de establecimientos de venta y reparación de motores ubicados en las cuadras del 1 al 5 de la Av. Libertadores. Ayacucho, 2011.

Especie	Gram	Forma	Esporas	Catalasa	Mov	Red del nitrato	Descomp de Tyr	Lizosima resistente	Lecitinasas	Ferm de glucosa	VP	Acido de manitol	Hemólisis
<i>Bacillus sp.</i>	+	Bacilo en cadena	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>Bacillus sp.</i>	+	Bacilo en cadena	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-

Tabla N° 8: Identificación de levaduras del Consorcio Uno, aislados de suelos contaminados con aceite lubricante usado alrededor de establecimientos de venta y reparación de motores ubicados en las cuadras del 1 al 5 de la Av.

Especie	TG	CHL	Tinta china	PH	FP	ART	LEV	37 °C	42 °C	Susceptibilidad a la Cichoeximina
<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Sensible
<i>Candida sp.</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Sensible
<i>Candida krusei.</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	-	Sensible
<i>Rhodotorula sp.</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	-	Variable

TG: Tubo germinativo	LEV: levaduras
CHL: Clamidosporas	PH: Seudohifas/hifas
FP: Formación de película	37 °C: Desarrollo a 37 °C
ART: Artroconidia	42 °C: Desarrollo a 42 °C

Especie	Asimilación de azúcares					
	Gluc	Lac	Sac	Gal	Mal	Raf
<i>Candida glabrata</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Candida sp.</i>	+	-	+	-	-	-
<i>Candida krusei.</i>	+	-	-	-	-	-

