# UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

## FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES

## CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

# "IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO EN ECOSISTEMA ACUÁTICO DE UNA ACTIVIDAD PETROLERA DE CORONEL PORTILLO-UCAYALI, 2018"

**TESIS PARA OPTAR TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**INGENIERO AMBIENTAL**

**RUTH LESLIE LLANCO PALOMINO**

**BRYAN ISRAEL REATEGUI DEL ÁGUILA**

**PUCALLPA – PERÚ**

**2020**

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

**COMISIÓN DE GRADOS Y TÍTULOS**

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 113

En el auditorio de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la UNU, siendo las diez horas con cincuenta minutos de la mañana (10:50 a.m.) del día jueves 09 de enero del 2020, se reunieron los miembros del jurado evaluador designado con memo múltiple 231-2019-UNU-FCFyA-CGT conformando por los siguientes docentes:

| | |
|---|---|
| Dr. Carlos Panduro Carbajal | Presidente |
| Dr. Manuel Mamani Flores | Secretario |
| Dr. Grober Panduro Pisco | Miembro |

Para evaluar la sustentación y defensa del trabajo de investigación **"IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO EN ECOSISTEMA ACUÁTICO DE UNA ACTIVIDAD PETROLERA DE CORONEL PORTILLO – UCAYALI 2018"**. Presentado por los bachilleres **LLANCO PALOMINO RUTH LESLIE Y REATEGUI DEL ÁGUILA BRYAN ISRAEL,** y asesorado por **Ing M. Sc DAVID LEÓN MORENO.**

Finalizando la sustentación se procedió a la formular las preguntas por parte del jurado, las mismas que fueron absueltas satisfactoriamente por los sustentantes, por lo que el jurado evaluador aprobó por **UNANIMIDAD** con el calificativo de **BUENO.** En consecuencia los sustentantes quedan aptos para obtener el título profesional de **INGENIERO AMBIENTAL**, previo levantamiento de las observaciones hechas por el jurado, siendo las doce horas del mediodía, se dio por concluido el acto académico y en señal de conformidad firmamos.

Dr. Carlos Panduro Carbajal
PRESIDENTE

Dr. Manuel Mamani Flores
SECRETARIO

Dr. Grober Panduro Pisco
MIEMBRO

## ACTA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por el jurado calificador de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad Nacional de Ucayali como requisito para obtener el titulo profesional de Ingeniero Ambiental, el mismo que estuvo integrado por los siguientes catedráticos:

Dr. Carlos Panduro Carbajal ..... PRESIDENTE

Dr. Manuel Mamani Flores ..... SECRETARIO

Dr. Grober Panduro Pisco ..... MIEMBRO

Ing M.Sc David León Moreno. ..... ASESOR

Bach. Ruth Llanco Palomino ..... TESISTA

Bach. Reategui Del Aguila Bryan Israel ..... TESISTA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
VICERRECTORADO DE INVESTIGACION
DIRECCION GENERAL DE PRODUCCION INTELECTUAL

# CONSTANCIA

## ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACION

## SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND

**N°034-2020**

La **Dirección General de Producción Intelectual**, hace constar por la presente, que el Informe Final (Tesis), titulado:

**IDENTIFICACION DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE PETROLEO EN ECOSISTEMA ACUÁTICO DE UNA ACTIVIDAD PETROLERA DE CORONEL PORTILLO-UCAYALI, 2018**

| | | |
|---|---|---|
| Cuyo autor (es) | : | **LLANCO PALOMINO, RUTH LESLIE** |
| | | **REATEGUI DEL AGUILA, BRYAN ISRAEL** |
| FACULTAD | : | CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES |
| ESCUELA PROFESIONAL: | | INGENIERIA AMBIENTAL |
| ASESOR | : | Ing. M.Sc. LEÓN MORENO, DAVID |

Después de realizado el análisis correspondiente en el Sistema Antiplagio URKUND, dicho documento presenta un **porcentaje de similitud de 10%.**

En tal sentido, de acuerdo a los criterios de porcentaje establecidos en el artículo 9 de la DIRECTIVA DE USO DEL SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND, el cual indica que no se debe superar el 10%. Se declara, que el trabajo de investigación: SI Contiene un porcentaje aceptable de similitud, por lo que SI se aprueba su originalidad.

En señal de conformidad y verificación se FIRMA Y SELLA la presente constancia.

**Fecha: 27/01/2020**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
DIRECCION GENERAL DE PRODUCCION INTELECTUAL
MGRA. DINA PARI QUISPE
Direc. Gral. Prod. Intel

**REPOSITORIO DE TESIS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TESIS**

Yo, Ruth Leslie Llanco Palomino

Autor de la TESIS titulada:

"Identificación de Bacterias degradadoras de Petróleo en Ecosistema acuático de una actividad Petrolera de Coronel Portillo - Ucayali, 2018"

Sustentada el año: 2020

Con la asesoría de: Ing. M.Sc. David León Moreno

En la Facultad de: Ciencias Forestales y Ambientales

Carrera Profesional de: Ingeniería Ambiental

Autorizo la publicación de mi trabajo de investigación en el Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Ucayali, bajo los siguiente términos: Primero: otorgo a la Universidad Nacional de Ucayali licencia no exclusiva para reproducir, distribuir, comunicar, transformar (únicamente mediante su traducción a otros idiomas) y poner a disposición del público en general mi tesis (incluido el resumen) a través del Repositorio Institucional de la UNU, en forma digital sin modificar su contenido, en el Perú y en el extranjero; por el tiempo y las veces que considere necesario y libre de remuneraciones. Segundo: declaro que la tesis es una creación de mi autoría y exclusiva titularidad, por tanto me encuentro facultado a conceder la presente autorización, garantizando que la tesis no infringe derechos de autor de terceras personas. Tercero: autorizo la publicación,

- [X] Total (significa que todo el contenido de la tesis en PDF será compartido en el repositorio).
- [ ] Parcial (significa que solo la carátula, la dedicatoria y el resumen en PDF serán compartidos en el repositorio).

De mi TESIS de investigación en la página web del Repositorio Institucional de la UNU.

En señal de conformidad firma la presente autorización.

Fecha: 11 / 03 / 2020

Email: rleslie_ingamb@Outlook.com

Firma:

Teléfono: 940208998

DNI: 75716686

**REPOSITORIO DE TESIS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TESIS**

Yo, Bryan Israel Reategui del Aguila
Autor de la TESIS titulada:
"Identificación de bacterias degradadoras de Petróleo en ecosistema acuático de una actividad Petrolera de coronel Portillo - Ucayali, 2018".

Sustentada el año: 2020
Con la asesoría de: Ing. M.Sc. David León Moreno
En la Facultad de: Ciencias Forestales y Ambientales
Carrera Profesional de: Ingeniería Ambiental

Autorizo la publicación de mi trabajo de investigación en el Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Ucayali, bajo los siguiente términos: Primero: otorgo a la Universidad Nacional de Ucayali licencia no exclusiva para reproducir, distribuir, comunicar, transformar (únicamente mediante su traducción a otros idiomas) y poner a disposición del público en general mi tesis (incluido el resumen) a través del Repositorio Institucional de la UNU, en forma digital sin modificar su contenido, en el Perú y en el extranjero; por el tiempo y las veces que considere necesario y libre de remuneraciones. Segundo: declaro que la tesis es una creación de mi autoría y exclusiva titularidad, por tanto me encuentro facultado a conceder la presente autorización, garantizando que la tesis no infringe derechos de autor de terceras personas. Tercero: autorizo la publicación,

- [x] Total (significa que todo el contenido de la tesis en PDF será compartido en el repositorio).
- [ ] Parcial (significa que solo la carátula, la dedicatoria y el resumen en PDF serán compartidos en el repositorio).

De mi TESIS de investigación en la página web del Repositorio Institucional de la UNU.
En señal de conformidad firma la presente autorización.

Fecha: 11 / 03 / 2020

Email: Shemaisrael942@gmail.com
Firma:

Teléfono: 999932113
DNI: 72740216

## DEDICATORIA

A Dios por darme la fortaleza en cada momento de mi vida y por la oportunidad de cumplir con cada uno de mis sueños y metas. Como dice su palabra en salmos 37:5 encomienda a Jehová tu camino, y confía en él, y el hará.

A mi madre Felicita Palomino García por su apoyo constante en todo este tiempo, por darme sus consejos y por darme ánimo para superarme cada día.

A mis hermanos Juan Carlos Llanco Palomino, John Rafael Llanco Palomino por sus apoyos durante todo este tiempo de mi carrera profesional.

A mi compañero Bryan Israel Reategui Del Aguilar por su paciencia y apoyo para poder culminar este proyecto.

**RUTH LESLIE LLANCO PALOMINO**

Todo en la vida y en el camino de un ser humano se encuentra a personas buenas que nos enseñan, nos ayudan y nos muestran que no estamos solos, es por ello que esta investigación la dedico a DIOS por ser el autor de toda esta historia y permitirme llegar a esta etapa de mi vida que es un peldaño más para lo mejor que tiene para mí;

A mis abuelos Wilfredo Reategui Pinedo, Aida Ines Paima Macedo, por ser mi claro ejemplo de lucha y perseverancia;

A mi Madre Elma del Águila Dias, por ser el ser más sublime y por enseñarme lo que significa esforzarse en la vida;

A mi Padre Rober Reategui Pima, por sus consejos que me ayudaron a tomar decisiones correctas,

A mi novia Milagros Valeria García Dávila, por ser mí soporte en los tiempos difíciles y por su incondicional apoyo para lograr este objetivo,

A mi compañera de tesis Ruth Leslie Llanco Palomino por su perseverancia e ímpetu que demostró en el trayecto de esta investigación.

**BRYAN ISRAEL REATEGUI DEL AGUILA**

## AGRADECIMIENTO


- En primer lugar, a Dios por darnos las vida, sabiduría y fuerzas necesarias para poder culminar esta investigación.

- A nuestras familias por el amor, apoyo y por todo este tiempo que confiaron en nosotros

- A la Universidad Nacional de Ucayali por brindarnos la oportunidad de realizarnos profesionalmente, a los docentes de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales por trasmitirnos sus conocimientos durante nuestra formación profesional.

- A nuestro asesor el Ing. M Sc. David León Moreno y co-asesor el Blgo. Eric Mananita Terrones por el asesoramiento.

- A la Facultad de Ciencias de la Salud por permitirnos realizar la tesis en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología.

- Al señor Paul Reátegui Ramos encargado del Laboratorio de Microbiología y Parasitología por brindarnos sus conocimientos, facilidad, paciencia, durante la realización de la tesis.

- A nuestros jurados Dr. Carlos Panduro Carbajal, Dr. Grober Panduro Pisco, Dr. Manuel Mamani Flores por sus correcciones oportunas.

- A las personas e instituciones quienes nos apoyaron en el desarrollo la investigación, a Natura Analítica S.A.C por la consideración en la provisión de insumos y la realización del análisis bioquímico y fisicoquímico.

- Al Blgo. Miguel Fabián Francisco, por su gentil apoyo.

## INDICE DEL CONTENIDO


**DEDICATORIA** ..... vii

**AGRADECIMIENTO** ..... viii

**ÍNDICE DE FIGURAS** ..... xii

**ÍNDICE DE TABLAS** ..... xiv

**RESUMEN** ..... xv

**ABSTRACT** ..... xvi

**INTRODUCCIÓN** ..... 1

**CAPITULO I** ..... 3

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA** ..... 3

**1.1. Formulación del problema** ..... 5

**CAPITULO II** ..... 6

**MARCO TEORICO** ..... 6

**2.1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA** ..... 6

**2.2. PLANTEAMIENTO TEORICO DEL PROBLEMA** ..... 11

**2.2.1. ¿Qué es un hidrocarburo?** ..... 11

**2.2.2. Destilacion fraccionada** ..... 26

**2.2.3. Composición del petróleo** ..... 15

**2.2.4. Comportamiento del petróleo en el ambiente** ..... 17

**2.2.5. Actividad petrolera** ..... 19

**2.2.6. Contaminación del suelo por hidrocarburos derivados del petróleo** ..... 20

**2.2.7. Contaminación del agua por hidrocarburos derivados del petróleo** ..... 23

**2.2.8. Petróleo en Perú** ..... 23

**2.2.9. La refinación del petróleo en el Perú** ..... 25

**2.2.10. Degradación de Hidrocarburos** ..... 27

**2.2.11. Papel de los microorganismos en la degradación de los hidrocarburos** ..... 27

**2.2.12. Factores que condicionan la degradación de hidrocarburos** ..... 29

**2.2.13. Degradación de las diferentes fracciones de hidrocarburos** ..... 32

**2.2.14. Química de la Biodegradación** ..... 33

**2.3. DEFINICION DE TERMINOS BASICOS** ..... 37

**2.3.1. Ecosistema lotico** ..... 37

**2.3.2. El agua** ..... 37

**2.3.3. Las propiedades químicas del agua** ..... 38

2.3.4. Aguas residuales ..... 38
2.3.5. Refinería de petróleo ..... 38
2.3.6. Generalidades de las bacterias degradadoras de hidrocarburos ..... 39
2.3.7. Biorremediación ..... 42
2.3.8. Biopelícula ..... 42
2.3.9. Sedimentos ..... 42
2.3.10. ACPM ..... 43
CAPITULO III ..... 44
METODOLOGIA ..... 44
3.1. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN ..... 44
3.2. DESCRIPCION DEL ÁMBITO DE ESTUDIO ..... 44
3.2.1. Ubicación del estudio ..... 45
3.2.2. Lugar de ejecución ..... 45
3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA ..... 46
3.3.1. Población ..... 46
3.3.2. Muestra ..... 46
3.4. INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS ..... 47
3.4.1. Materiales e instrumentos de campo ..... 47
3.4.2. Materiales y equipos de gabinete ..... 48
3.4.3. Recolección de datos ..... 48
3.5. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE DATOS ..... 49
3.5.1. Obtención y acondicionamiento de muestras ..... 49
3.5.2. Crecimiento de microorganismos degradadores ..... 50
3.5.3. Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos ..... 53
3.5.4. Identificación bioquímica ..... 53
3.6. PROCESAMIENTO PARA RECOLECCIÓN DE DATOS ..... 54
3.6.1. Crecimiento de microorganismos degradadores ..... 54
3.6.2. Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos ..... 55
3.6.3. Identificación bioquímica ..... 56
3.7. TRATAMIENTO DE DATOS ..... 56
CAPITULO IV ..... 57
RESULTADO ..... 57
4.1. Tipos de bacterias identificadas ..... 57
4.2. Caracterización de parámetros fisicoquímicos ..... 71
CAPITULO V ..... 72

**DISCUSION** ..... **72**
**5.1. Identificación de bacterias** ..... **72**
**5.2. Parámetros Fisicoquímicos** ..... **75**
**CAPITULO VI** ..... **77**
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES** ..... **77**
**6.1. CONCLUSIONES** ..... **77**
**6.2. RECOMENDACIONES** ..... **77**
**REFERENCIA BIBLIOGRAFICA** ..... **79**
**ANEXOS** ..... **86**

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema de la destilación fraccionada del petróleo……...15

**Figura 2.** Proceso de degradación de los hidrocarburos…..……..……17

**Figura 3.** Refinería en el Perú……..……26

**Figura 4.** Rutas metabólicas del Tolueno por diferentes bacterias……33

**Figura 5.** Proceso bioquímico de degradación …….....37

**Figura 6.** Área de estudio…….....45

**Figura 7**. Recolección de muestras ……..….50

**Figura 8.** Selección de muestras de Pre-enriquecimiento ……..55

**Figura 9.** Selección de muestras de Enriquecimiento……...55

**Figura 10.** Selección de muestras para aislamiento ……..……..…...56

**Figura 11.** Porcentaje de bacterias identificadas ……..……..57

**Figura 12**. Bacterias Identificadas en muestras de sedimento L1 (Entrada) …59

**Figura 13**. Bacterias Identificadas en muestras de sedimento L2 (Salida)……59

**Figura 14**. Bacterias Identificadas en muestras de sedimento L1 (Entrada) - L2 (Salida) .....……60

**Figura 15**. Bacterias Identificadas en muestras de agua superficial A1(Entrada) ……...61

**Figura 16**. Bacterias Identificadas en muestras de agua superficial A2 (Salida)…….. 61

**Figura 17**. Bacterias Identificadas en muestras de agua superficial A1 (Entrada) - A2 (Salida)…….62

**Figura 18**. Bacterias identificadas en muestras de sedimento y agua superficial ……. 63

**Figura 19.** Muestras en la etapa de pre-enriquecimiento……...…64

**Figura 20.** Muestras de agua superficial en la etapa de enriquecimiento…….65

**Figura 21.** Muestras de sedimento en la etapa de enriquecimiento……..65

**Figura 22.** Muestras de entrada de sedimentos ……...66

**Figura 23**. Muestras de salida de sedimento……....68

**Figura 24**. Muestras de entrada de Agua Superficial……...69

**Figura 25**. Muestras de salida de Agua Superficial……...71

**Figura 26.** Test químicos aplicados a medios biológicos……..…..89

**Figura 27.** Muestra de entrada de la quebrada que discurre por medio de la refinería Maple……..……..…...90

**Figura 28.** Muestra de salida de la quebrada que discurre por medio de la refinería Maple……..……...90

**Figura 29.** Preparación del caldo de pre-enriquecimiento ……..……90

**Figura 30**. Preparación del caldo de enriquecimiento ……....91

**Figura 31**. Inoculación de muestras ……..….91

**Figura 32**. Equipos de campo……..……92

**Figura 33**. Inoculación en placa petri……...….92

**Figura 34.** Proceso de degradación del crudo de petroleo……..……93

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1:** Bacterias degradadoras de hidrocarburos……..29

**Tabla 2**. Códigos de muestreo……..47

**Tabla 3.** Cantidad de muestras…….……54

**Tabla 4.** Codificación de muestras……..…..…54

**Tabla 5.** Identificación de especies y/o Géneros bacterias……..……..….58

**Tabla 6.** Parámetros fisicoquímicos de muestras……..71

**Tabla 7.** Componentes del caldo pre-enriquecimiento……...….86

**Tabla 8.** Componentes de enriquecimiento……..…….……86

**Tabla 9.** Componentes del medio mineralizado…….....86

**Tabla 10.** Componentes para el repique con agar……..……..86

**Tabla 11.** Análisis de las muestras de sedimento y agua superficial…..……..87

## RESUMEN

La investigación consistió en la identificación de bacterias degradadoras de petróleo en un ecosistema acuático impactada por actividad de hidrocarburo en el distrito de Callería, Provincia de Coronel Portillo, Región Ucayali. Las muestras tomadas fueron provenientes de la quebrada Anis Caño que atraviesa la empresa MAPLE GAS, de lo cual para las muestras se seleccionaron el punto 01 con coordenadas 08º23'28"S, 74º31'53"W, y punto 02, con coordenadas 08º23'36"S, 74º31'55"W, se aplicó el método de investigación exploratorio. En el proceso, las muestras se sometieron a pre - enriquecimiento por una semana, a enriquecimiento por tres semanas y un proceso de identificación bioquímica, donde se evidenciaron cambios en las propiedades crudo del petróleo, como la turbidez y agregados blancos por crecimiento bacteriano. Como resultado se identificaron cinco (05) géneros bacterianos: (i) *Pseudomonas aeruginosas*, (ii) *Serratia sp*, (iii) *Enterobacter sp*, (iv) *Citrobacter sp, (v) Acinetobacter sp*., de los cuales, el de mayor predominancia en casi todas las muestras fue *Pseudomonas aeruginosas*, confirmando su gran capacidad de adaptación en ambientes contaminados de este tipo.



**Palabras claves:** Enriquecimiento, crecimiento bacteriano, géneros bacterianos.

## ABSTRACT

The investigation consisted of the identification of petroleum degrading bacteria in an aquatic ecosystem impacted by hydrocarbon activity in the district of Callería, Province of Coronel Portillo, Ucayali region. The samples taken were from the Anis Caño stream that crosses the MAPLE GAS company, from which for the samples point 01 was selected with coordinates 08º23'28 "S, 74º31'53" W, and point 02, with coordinates 08º23 ' 36 "S, 74º31'55" W, the exploratory research method was applied. In the process, the samples were subjected to pre - enrichment for one week, to enrichment for three weeks and a biochemical identification process, where changes in crude oil properties, such as turbidity and white aggregates due to bacterial growth, were evidenced. As a result, five (05) bacterial genera were identified: (i) *Pseudomonas aeruginosa*, (ii) *Serratia sp*, (iii) *Enterobacter sp*, (iv) *Citrobacter sp*, (v) *Acinetobacter sp*., Of which, the most predominant in almost all samples it was *Pseudomonas aeruginosas*, confirming its great adaptability in contaminated environments of this type.



**Keywords:** Enrichment, Bacterial growth, bacterial genres

# INTRODUCCIÓN

El petróleo con sus cuatro fracciones, hidrocarburos saturados, hidrocarburos aromáticos, resinas y asfáltenos, es un compuesto muy complejo, considerado el contaminante más extendido en la biosfera, por lo tanto, un problema global (Alexander, 1999). Representa la mayor fuente energética y la base para la obtención de materias primas para la industria. Su explotación, transporte y refinación generan problemas ambientales, especialmente por derrames accidentales y de prácticas inadecuadas de eliminación de fuentes, como industrias y refinerías de petróleo (Saleh, Drobiova, & Obuekwe, 2009).

A nivel mundial, el volumen de derrame anual de petróleos de unos 1,7 a 8.8 millones de toneladas métricas (Escalante, 2002); teniendo en cuenta que independientemente de la zona afectada (lagos, suelos, zonas freáticas, ríos y playas) por procesos biológicos y físicos, los hidrocarburos tienen como destino final los mares y océanos (Shanidul & Tanaka, 2004).

La persistencia de estos contaminantes en el ambiente se ve influenciada por varios factores como la naturaleza del contaminante, su concentración y su capacidad para interactuar con las condiciones químicas, geológicas, físicas y biológicas del sitio contaminado. La fracción aromática del petróleo compuesta por di cíclicos, tri cíclicos y heterocíclicos (naftaleno, antraceno, fenantreno y dibenzotiofeno), conlleva un problema ambiental en aguas y suelos, con gran impacto ecológico y efectos recalcitrantes y tóxicos en los seres vivos, siendo los poliaromáticos y los heterocíclicos los más remanentes, o persistentes, generando como consecuencia efectos a largo plazo sobre las comunidades bentónicas en sedimentos marinos, debido a que su remoción natural es muy lenta (Chaerun, Tazaki, Asada, & Kogure, 2004).

Con el fin de contrarrestar los efectos nocivos causados por la presencia del petróleo en los ecosistemas marinos se han desarrollado técnicas físicas, químicas y biológicas que buscan remover el mejor porcentaje del

contaminante y disminuir el impacto generado tras un derrame o acumulación progresiva. Entre las diversas técnicas, la biodegradación es considerada actualmente la alternativa menos costosa para trasformar contaminantes presentes en diversos ecosistemas, teniendo en cuenta de gran variedad de bacterias cuenta con la maquinaria enzimática para transformar los compuestos xenobióticos persistentes y estas pueden ser aisladas de lugares donde haya existido una previa exposición al contaminante (Márquez, Hernández, & Lamela, 2001).

Existe una gran variedad de microorganismos identificados en la degradación de compuestos derivados del petróleo (Valderrama & Téllez-Sosa, 2000), destacando el género *Pseudomonas* que está constituida por bacterias tipo bacilar Gram negativos, con flagelo polar, catalasa positivos y no forman esporas, demuestra una gran diversidad metabólica, y consecuentemente son capaces de colonizar un amplio rango de nichos.

En ese sentido, el propósito de la investigación es brindar una alternativa de solucionar a la contaminación por derrames de petróleo, teniendo como objetivo general: conocer las bacterias degradadoras de petróleo presentes en ecosistemas acuáticos en Pucallpa – 2018, y como objetivos específicos: Determinar el grupo de bacterias predominantes que se encuentran en el caño de ingreso y salida a una actividad petroquímica.

Por consiguiente, esta investigación entrega como principal resultado: la identificación de bacterias en muestras de una actividad de refinería y los parámetros fisicoquímicos presentes en ella.

# CAPITULO I

# PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sector de hidrocarburos se ha expandido de manera importante en los últimos años, convirtiéndose en pieza clave del crecimiento de la economía mundial (Castro, Forero, Ramirez, & Reina, 2014), lo cual ha generado también un crecimiento significativo de la contaminación por hidrocarburos.

Los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmosfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos, como evaporación y penetración, que, dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida pueden ser procesos más o menos lentos lo que ocasiona una mayor toxicidad (Benavides, y otros, 2006); generando de esta manera graves consecuencias ambientales tanto en la flora como en la fauna. Díaz-Martínez *et al.* (2013), reportan que dichas sustancias tienden a acumularse y a formar una capa hidrofóbica, induciendo la fragmentación de los agregados, causando reducción, inhibición de la cobertura vegetal y la modificación de las poblaciones microbianas del ambiente edáfico.

Los cuerpos de agua como lagos, ríos y humedales ofrecen una variedad de recursos y comunidades acuáticas que pueden ser amenazadas por derrames de hidrocarburos. Los hidrocarburos tienden a flotar debido a la diferencia de densidad que presentan con respecto al agua, bloqueando de esta manera la penetración de la luz y el intercambio de gases. Adams *et al.* (2008), reportan que dicho bloqueo favorece la solubilización de materiales que afectan a las distintas poblaciones como el plancton o los micro invertebrados que viven en el fondo de ríos y pantanos.

Mendelssohn *et al.* (2012), de igual forma, reportan que la mayor parte de los componentes tóxicos y volátiles son eliminados por evaporación, mientras, otros se oxidan por la radiación UV en la luz del sol, todo esto depende del peso molecular, debido a que, algunos compuestos tóxicos de los hidrocarburos pueden disolverse en el agua y degradarse mientras otros

presentan la capacidad de depositarse en los sedimentos. Cualquiera que sea la respuesta o acción de dichas sustancias la fauna y flora del lugar es la primera y directamente afectada.

Así mismo, González *et al.* (2011), han reportado efectos letales y subletales de hidrocarburos del petróleo en los peces.

En este contexto, comenzaron las investigaciones con fines de dar solución a la contaminación del petróleo, identificándose a los factores biológicos un recurso importante en la eliminación de contaminantes que se encuentran en la diversidad de especies microbianas y sus capacidades metabólicas. Existen bacterias capaces de utilizar petróleo para su crecimiento y mantenimiento, conocidas como bacterias degradadoras de hidrocarburos, dentro de las cuales se encuentra el género *Pseudomonas*, que por su versatilidad metabólica, son capaces de convertir sustratos habitualmente no degradables, en metabolitos fácilmente asimilables o susceptibles de ser catalizados enzimáticamente (Mackey & Hoddgkinson, 1996).

En los últimos años, la ecología microbiana ha direccionado esfuerzos en determinar cuáles son los microorganismos capaces de adaptarse y de explorar hábitats contaminados; para ello, han sido desarrollados estudios de diversidad, dinámicas poblacionales y de comunidades presentes en suelos contaminados, especialmente aquellas relacionadas con asociaciones de bacterias biodegradadoras (Bracho, Diaz, & Soto, 2004).

Así en la biodegradación de hidrocarburos, se utilizan bacterias con alta capacidad degradativa entre estas tenemos: *Brevibacterium, Spirillum, Xanthomonas, Alcaligenes, Arthrobacter, Nocardia, Flavobacterium, Vibrio, Achromobacter, Acinotebacter, Micrococcus, Pseudomonas aeruginosa, Serratia rubidae, Bacillus sp, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas aureofasciens*, etc., las cuales disminuyen la concentración de hidrocarburos presentes en el ambiente y al mismo tiempo son inocuas para la salud y el medio ambiente (Atlas & Bartha, 1997).

## 1.1. Formulación del problema

- **Problema general**

  ¿Qué bacterias degradadoras de petróleo están presentes en ecosistemas acuáticos en Pucallpa-2018?

- **Problema especifico**

  ¿Qué grupo de bacterias predominantes son degradadoras de petróleo en el caño de ingreso y salida a una actividad petroquímica?

  ¿Cuáles son los parámetros fisicoquímicos del agua de ingreso y salida a una actividad petroquímica?

# CAPITULO II

# MARCO TEORICO

## 2.1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

- **Actividad petrolera**

  La actividad petrolera está contaminando de manera generalizada las cabeceras de los ríos del Amazonas y modificando la composición química de sus aguas, según se desprende de un estudio llevado a cabo por investigadores del Institut de Ciència y Tecnologia Ambientals y del Departamento de Sanidad y Anatomía Animales de la Universitat Autònoma de Barcelona (ICTA-UAB), así como del International Institute of Social Studies de la Universidad Erasmus de Rotterdam (ISS-EUR), que ha cuantificado el impacto ambiental que los vertidos procedentes de la actividad extractiva.

  La investigación, publicada en la revista Environmental Pollution, forma parte de un amplio proyecto científico desarrollado por ambos grupos para analizar los preocupantes niveles de contaminación por petróleo existentes en una zona de la Amazonía peruana próxima a la frontera con Ecuador. Aunque éramos conscientes que se estaba produciendo, no existía evidencia científica sobre el impacto ambiental de los vertidos petroleros en la zona. No se había podido cuantificar al tratarse de zonas muy remotas y de difícil acceso", explica Antoni Rosell, investigador ICREA en el ICTA-UAB. Para llevar a cabo el estudio se han analizado datos de 2.951 muestras de agua superficial de cuatro ríos del Amazonas recogidas por agencias públicas peruanas y empresa petroleras entre los años 1987 y 2013 (Rosell, 2013).

  Por cada barril de petróleo producido, las empresas extraen hasta 98 barriles de agua de formación que han sido vertidas directamente al suelo y a los ríos de la selva tropical de la amazonía norte peruana desde 1972 hasta 2009. Estas aguas contienen niveles de cloruro 13.379 veces superiores a las aguas de los ríos amazónicos, mientras

que los índices de cromo, cadmio, plomo, bario sobrepasan los límites permitidos. Estas grandes concentraciones de metales pesados y sales están modificando la composición química de las cabeceras de los ríos del Amazonas y alterando uno de los ecosistemas más preservados y naturales del mundo. “Se estima que, en la actualidad, las aguas del río Amazonas superan en un 30% su concentración natural de sales” (Rosell, 2016).

Esta contaminación local fruto de la actividad hidrocarburífera que tiene una implicación suprarregional y transnacional muy amplia, ya que los vertidos en las cabeceras de los ríos impactan en las zonas más bajas del Amazonas. Así pues, la polución se extiende a miles de kilómetros de ríos, sedimentos y suelos, dando lugar a la bioacumulación de metales pesados en peces, animales y las personas que se alimentan de la pesca fluvial y de la caza de animales que ingieren aguas de formación en un intento de suplir la carencia de sales minerales que presenta su dieta habitual (Rosell, 2016).

Esta contaminación no sólo estaría impactando directamente a la fauna silvestre en general de una región que es mega diversa y donde habitan algunas especies que ya se encuentran en peligro de extinción, sino que además afecta a las comunidades indígenas que dependen de la caza y la pesca como fuente de proteína animal (Pedro Mayor, UAB 2016).

Durante años, la mala práctica ambiental por parte de las empresas petroleras ha sido denunciada por las poblaciones indígenas, hasta que el gobierno peruano declaró la zona en emergencia ambiental en 2013 y en emergencia sanitaria en 2014. No obstante, ahora hemos podido cuantificar los compuestos que se están vertiendo”, indica Martí Orta, coautor del estudio, quien explica que durante muchos años se negó que la contaminación de plomo en la selva procediera de la actividad hidrocarburífera “sin tener en cuenta que el millón de barriles diarios de las aguas de formación vertido en la zona sí contienen plomo, (Martí Orta, 2016).

Los derrames accidentales a gran escala presentan un volumen significativo de contaminantes en todo el mundo. Lastimosamente, son varios los ejemplos que se pueden citar, entre estos está el derrame del Exxon Valdez en Alaska en 1989 y el derrame de BP Deepwater Horizon en el Golfo de México en 2010 catalogados como los dos peores desastres ambientales en la historia de los Estados Unidos que aún están afectando algunos de los ecosistemas marinos más productivos y vulnerables (Spier, 2013).

Sin embargo, este tipo de contaminación relacionada con sustancias derivadas del petróleo no tiene origen exclusivo en las actividades petroleras; la literatura permite conocer que existe un aporte masivo y continuo que proviene de labores diversas, tales como: la pesca; el transporte marítimo y de cabotaje; las operaciones de limpieza de buques y los expendios de combustible a embarcaciones pequeñas, cuyo suministro se realiza a través de mangueras, sin llave de cierre al final; el vertimiento de los residuos del cambio de aceite, las latas de lubricante en lanchas, y el descargue de sentinas de los buques pequeños caen directamente al agua (Jimènez, 2006).

- **Microorganismos que degradan hidrocarburos**

Ahora se sabe que durante el proceso de degradación del petróleo intervienen varias especies de bacterias y que gracias a la participación y combinación de los diferentes procesos metabólicos de las bacterias presentes en ambientes marinos pueden alcanzarse tasas de consumo hasta del 100% (Das & Chaldran, 2011).

La variabilidad de especies y géneros, se debe a que diferentes bacterias tienen afinidad por ciertos hidrocarburos, como se ha observado en *Acinetobacter sp*., *Pseudomonas sp*. y *Mycobacterium sp*. Las cuales degradan alcanos, monoaromáticos y poliaromáticos respectivamente (Salleh, Ghazali, & Rahman, 2003).

Sin embargo, también se ha visto que pueden participar en sintrofía. En condiciones anaerobias durante la degradación de alcanos, se ha

observado la participación de bacterias sulfatorreductoras y metanogénicas (Morris, Henneberger, Huber, & Moissl-Eichinger, 2013).

Otros factores importantes que determinan a las poblaciones microbianas durante la degradación del petróleo son los factores abióticos de la zona (pH, temperatura, salinidad, oxidoredox, etc.), así como las propiedades fisicoquímicas del petróleo (ligero o pesado). La combinación de ambos factores puede favorecer o afectar la diversidad bacteriana (Das & Chandran, 2011).

Hazen et al. (2010) reportaron un cambio de las comunidades microbianas, entre las zonas contaminadas y las de sus alrededores en estudios de ecología microbiana a 1 500 metros de profundidad. Estas variaciones fueron asociadas principalmente a las diferencias en la concentración de oxígeno y al petróleo, ya que observaron un gradiente de concentración y de transformación del petróleo a lo largo de la pluma de contaminación.

Existen varios reportes de las bacterias que participan en la degradación del petróleo (Zobell, 1946). En el caso del Golfo de México se ha encontrado una gran diversidad microbiana, como se ha observado en estudios llevados a cabo en zonas de las costas de Florida, Campeche, Veracruz y en el delta del río Mississipi que han sido afectadas por derrames de petróleo. En estos sitios se han detectado al-rededor de 24 especies de bacterias distribuidas en 14 géneros. Entre los que se encontraron: *Gammaprotobacteria, Marinobacter, Pseudomonas* y *Acinetobacter* (kostka & Prakash, 2011), así como algunos géneros de bacterias hidrocarbonoclastas como *Alcanivorax, Marinobacter, Thallassolituus, Cycloclasticus y Oleispira* (Mortazavi, Horel, Beazley, & Sobecky, 2013).

Según el Artículo de la Revista (Investigación de Biotecnología Internacional, 2011) en el artículo publicado con nombre: “La degradación microbiana de los contaminantes de hidrocarburos de

petróleo: Una visión general", Nos dice que, las bacterias son los agentes más activos en la degradación de petróleo, y trabajan como agentes de degradación primaria, se alimentan exclusivamente de hidrocarburos. En el *Acinetobacter sp*. se encontró la capacidad de utilizar n-alcanos de longitud de cadena C10-C40 como única fuente de carbono. Géneros de bacterias, a saber, *Gordonia, Brevibacterium, Aeromicrobium, Dietzia, Burkholderia*, y *Mycobacterium* aislado de tierra contaminada de petróleo resultaron ser los organismos potenciales para la degradación de hidrocarburos (Yaya, 2017).

Se analizó un consorcio microbiano que consistió en dos cepas de *Pseudomonas aeruginosas* y *Rhodococcus erythropolis* un aislado de tierra contaminada con lodo aceitoso se utilizó en este estudio. El consorcio tubo la capacidad de reducir el 90% de hidrocarburos en 6 semanas en cultivo líquido, se probó en dos ensayos de campos independientes. Además, el efecto de dos aditivos (una mezcla de nutrientes y una preparación biosurfactante bruto sobre la eficiencia del proceso también se evaluó. El consorcio degradado 91% del contenido de hidrocarburos de la tierra contaminada con 1% (v / v), los lodos de petróleo crudo en 5 semanas. Se utilizó un aditivo junto con el consorcio que provoco un agotamiento de 91% a 95% del contenido de hidrocarburos en 4 semanas, con la preparación biotensioactivo crudo (Yaya, 2017).

Díaz y col., en (1999), en México, evaluaron la biodegradación de hidrocarburos por un consorcio microbiano de la rizósfera de Cyperus laxus Lam. Primero sembraron el consorcio microbiano en un medio mineral líquido que contenía hidrocarburos (35 000 ppm) como única fuente de carbono y energía, luego lo incubaron a 30 ºC en agitación a 125 r.p.m. durante trentaicuatro días con su control respectivo, al cabo de ese tiempo cuantificaron la concentración de hidrocarburos, obteniendo una biodegradación del 62.28%.

Arenas, en (1999), en Lima, aisló 262 cepas bacterianas, a partir de muestras de suelo y agua de la refinería "La Pampilla", de las cuales se

seleccionaron 55 cepas bacterianas, que fueron las de mayor actividad emulsificante, a las cuales se les evaluó su actividad degradativa. El 100 % crecieron sobre el petróleo y mostraron crecimientos comparables a las escalas dos, tres, cuatro y cinco de Mc. Farland. Los microorganismos aislados fueron *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas aureofasciens, Listonella damsela, Bacillus sphaericus, Bacillus brevis, Enterobacter cloacae, Acinetobacter calcoaceticus var. Anitratus, Hafnia alvei, Citrobacter freundii, Citrobacter amalonaticus, Sphingobacterium multivorum, Staphylococcus Sp., Neisseria Sp., Micrococcus sp*.

Rentería y Miranda, en (1998), en Trujillo, realizaron el aislamiento y selección primaria de microorganismos capaces de utilizar petróleo como única fuente de Carbono. Ellos evaluaron el crecimiento sobre petróleo de noventa cepas bacterianas provenientes de muestras de agua y suelo contaminadas con petróleo crudo, cinco cultivos mostraron mayor actividad: *Micrococcus, Pseudomonas, Alcaligenes, Acinetobacter* y *Flavobacterium*, los que fueron evaluados a través de los parámetros cinéticos velocidad específica de crecimiento y tiempo generacional. Tantaleán y Altamirano, en 1998, en Ica, realizaron el aislamiento y evaluación del crecimiento de *Pseudomonas spp*. hidrocarburoclásticas en petróleo diesel 2 (D2) y compararon el crecimiento de tres cultivos puros y uno mixto de *Pseudomonas sp*. nativas que tuvieron la mayor capacidad para utilizar el petróleo D2. La mejor capacidad de biodegradación de petróleo D2 se logró en el cultivo mixto.

## 2.2. PLANTEAMIENTO TEORICO DEL PROBLEMA

### 2.2.1. ¿Qué es un hidrocarburo?

Los Hidrocarburos son compuestos químicos constituidos principalmente por átomos de carbono e hidrógeno (SERMANAT, 2003). Los hidrocarburos pueden contener otros elementos en menor proporción como son oxígeno, nitrógeno, azufre, halógenos (cloro, bromo, iodo y flúor), fósforo, entre otros. Su estado físico, en condiciones ambientales,

puede ser en forma de gas, líquido o sólido de acuerdo al número de átomos de carbono y otros elementos que posean. Se funden a temperaturas relativamente más bajas que los compuestos minerales o inorgánicos (PEMEX, 1999). Los hidrocarburos pueden clasificarse de acuerdo con la división de los compuestos orgánicos, en la siguiente forma: alifáticos y aromáticos (alcaldía mayor de bogotá d.c., 2004).

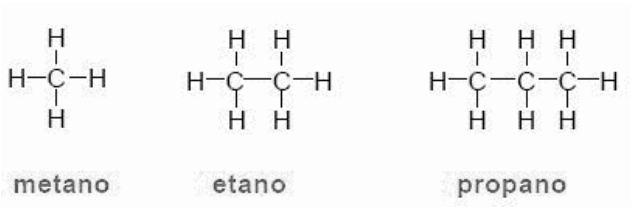
### 2.2.1.1. Composición por familias de hidrocarburos

**A) Hidrocarburos alifáticos:**

En este primer apartado, los átomos de carbono se disponen formando una cadena lineal; éstos se subdividen en:

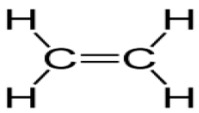
- **Alcanos**

  Son hidrocarburos saturados que también reciben el nombre de parafínicos, Se presentan en estado gaseoso, líquido o sólido según el tamaño de la cadena de carbonos. Hasta 4 ó 5 carbonos son gases, de seis a 12 son líquidos y de 12 y superiores se presentan como sólidos aceitosos tienen enlaces simples (Rodriguez, 2018).




- **Alquenos**

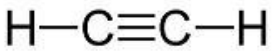
  Hidrocarburos insaturados, son los que tienen uno o más carbonos con enlaces dobles (Rodriguez, 2018):



- **Alquinos**

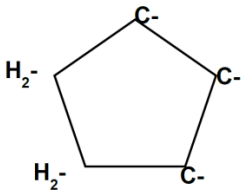
  Hidrocarburos insaturados que cuentan con enlaces triples entre sus átomos de carbono, estos enlaces se caracterizan por ser más

fuertes que los simples, por lo que su degradación requiere de una mayor aportación de energía (Rodriguez, 2018).

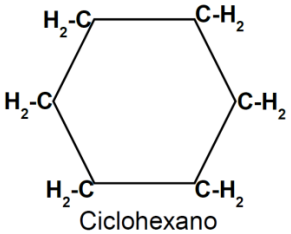


**B) Hidrocarburos cíclicos:**

- **Hidrocarburos policíclicos.**
  Son los que tienen cadenas cerradas de 3, 4, 5, 6, 7 y 8 átomos de carbono saturados o no saturados. Como ejemplo, encontraríamos el ciclohexano y ciclopentano (Rodriguez, 2018):

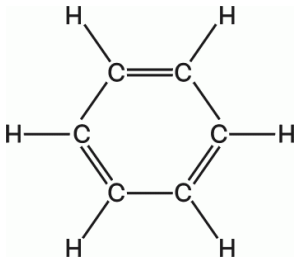


Ciclopentano



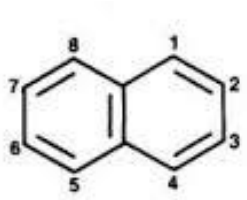
Ciclohexano

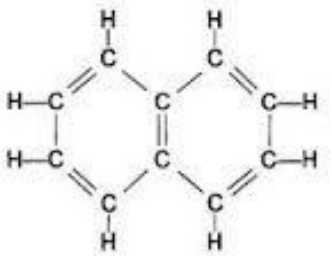
- **Hidrocarburos aromáticos**
  Son hidrocarburos que cuentan al menos un anillo aromático aparte de otros tipos de enlaces que puedan tener. El más representativo de la familia de los hidrocarburos aromáticos es el benceno (C6H6), pero existen otros ejemplos, como el tolueno, etilbenceno y xileno, muy perjudiciales para la salud por estar implicados en numerosos tipos de cáncer y que habrán de tomar muchas medidas al respecto en caso de fugas o derrames (Rodriguez, 2018).



- **Hidrocarburos naftalénicos o hidrocarburos aromáticos policíclicos.**

  Los hidrocarburos aromáticos policíclicos también conocidos por sus siglas, HAP's; están constituidos por dos o más anillos fusionados, con resonancia electrónica entre sus átomos de carbono. Los HAP´s constituyen contaminantes orgánicos relacionados con las actividades humanas, en especial con aquellas derivadas del tratamiento y posterior combustión del petróleo y sus derivados. Son compuestos estables y altamente tóxicos, algunos potentes carcinógenos y otros mutagénicos (Rodriguez, 2018).



Estos compuestos se encuentran distribuidos en el suelo, mar, sistemas fluviales y sedimentos, su presencia se ha atribuido principalmente a los derrames de petróleo y descargas de plantas petroquímicas.

Algo que es muy común en cualquiera de los grupos de hidrocarburos expuestos más arriba es la sustitución de uno o varios de sus hidrógenos por otro átomo o grupos funcionales que se mencionarán más adelante. La importancia de estas sustituciones se debe a que, variará el comportamiento químico de molécula, también lo hará la facilidad con la que estos compuestos podrán ser biodegradados (Rodriguez, 2018).

### 2.2.2. Destilación fraccionada

La refinación del crudo involucra una serie de procesos tanto físicos como químicos a los cuales se somete el petróleo crudo, los productos que se obtienen de ellos tienen diferentes rendimientos ya que estos dependen del origen del crudo; para ajustar estos rendimientos al patrón

de consumo algunas de las fracciones se someten a diversos procesos de conversión se lleva a cabo por medio de la destilación fraccionada. Estos procesos pueden ser de tres tipos: procesos de destilación, procesos de desintegración y procesos de purificación. En el proceso se calienta el petróleo crudo a una temperatura en la cual los componentes ligeros se evaporan y a continuación se condensan los hidrocarburos en fracciones aprovechando las diferencias en los puntos de ebullición. La composición de cada fracción se identifica por su intervalo de ebullición y no se obtienen compuestos puros (Gaceta UNAM, 1988,pp 16-19).

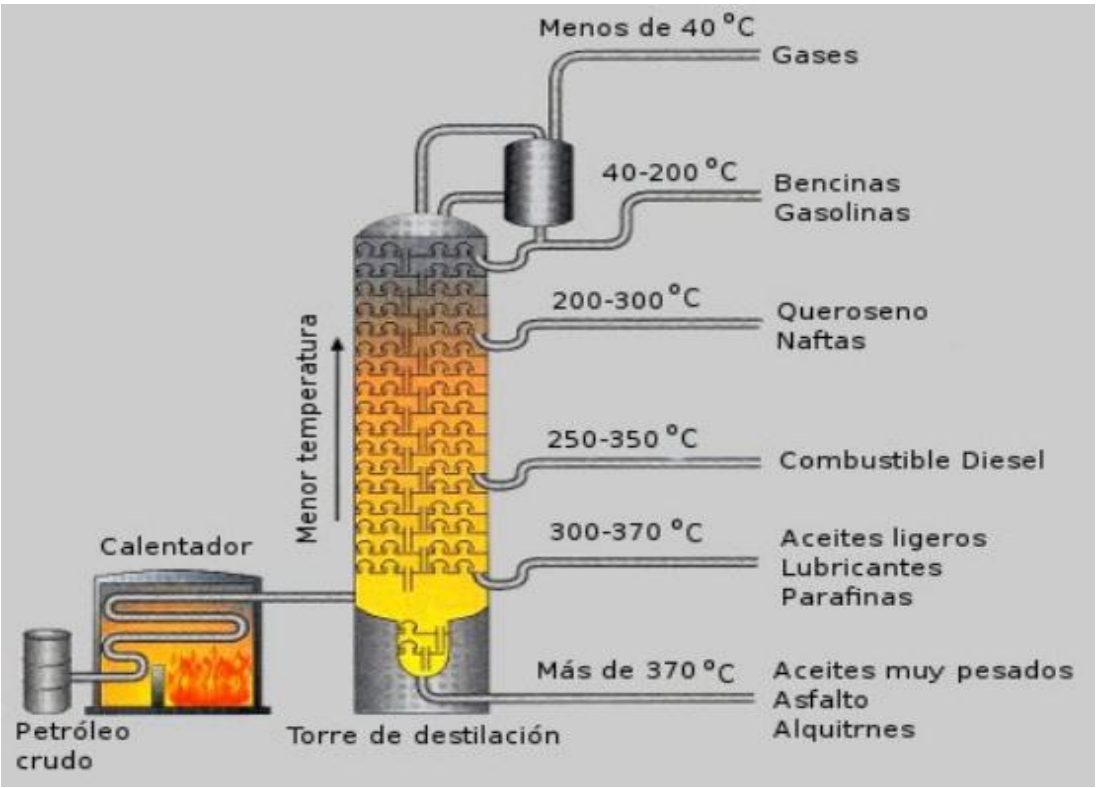



**Figura 1**: Esquema de la destilación fraccionada del petróleo.

### 2.2.3. Composición del petróleo

Para entender los procesos de biorremediación de suelos contaminados con el Petróleo y sus derivados es necesario comprender la composición química del Petróleo. Es un compuesto de hidrocarburos, básicamente una combinación de carbono e hidrógeno (Pémex, 1988).

Al analizar petróleo de diversas procedencias, puede decirse de manera general que lo forman los siguientes elementos químicos: de 76 a 86%

de carbono y de 10 a 14% de hidrógeno; a veces contiene oxígeno, azufre y nitrógeno. También se han encontrado huellas de compuestos de hierro, níquel, vanadio y otros metales (Chang y Tsao, 1984; Pavia et al., 1990).

Mientras mayor sea el contenido de carbón en relación con el del hidrógeno, mayor es la cantidad de productos pesados que tiene el crudo. Esto depende de la antigüedad y de algunas características de los yacimientos. No obstante, se ha comprobado que entre más viejos son los yacimientos, tienen más hidrocarburos gaseosos y sólidos y menos líquidos entran en su composición.
El número de átomos de carbono y la forma en que están unidos, ya sea en cadenas lineales, cerradas o ramificadas, proporciona al petróleo diferentes propiedades físicas y químicas. Así tenemos que el metano al ser un hidrocarburo compuesto por un átomo de carbono y cuatro átomos hidrogeno tiene el estado físico gaseoso; los hidrocarburos con cadenas

Los hidrocarburos del petróleo pueden dividirse en cuatro categorías de compuestos:

- Los saturados: los alcanos como el hexano, el octano, el decano, el hexadecano, los isoalcanos y los cicloalcanos como el ciclohexano.
- Los aromáticos: benceno, tolueno, xileno y naftaleno agrupados también bajo la apelación BTEX y los poliaromáticos o PAHs (Rittman, 1994).
- Las resinas: sólidos polares amorfos disueltos que contienen nitrógeno, azufre y oxígeno.
- Los asfaltenos: grandes moléculas polares coloidales sin disolver que son más resistentes a la biodegradación (Balba, Al-Awadhi, & Aldaher, 1998)

En términos generales, de un 70 a un 97% de los hidrocarburos del petróleo es degradable (la fracción de hidrocarburos saturados y aromáticos) y el resto representa los asfaltenos y las resinas esencialmente inertes (Prince, Varadaja, & Fiocco, 1999).

### 2.2.4. Comportamiento del petróleo en el ambiente

El proyecto de recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos a cargo de Riesco (2012) indica que un derrame de petróleo lleva consigo una serie de cambios progresivos de sus propiedades fisicoquímicas los cuales se atribuyen al proceso de intemperización, el cual incluye: evaporación, disolución, dispersión, oxidación, emulsificación, sedimentación y biodegradación. La intemperización es la pérdida de ciertos componentes del petróleo a través de una serie de procesos naturales que comienzan una vez que ocurre el derrame y continúan indefinidamente. La tasa de intemperización del petróleo varía en función de las características del producto derramado y de las condiciones climáticas existentes en el lugar del derrame. Generalmente va referida a vertidos al aire libre no en el subsuelo, pero en algunos casos el derramen se produce a ras del suelo y de ahí percola hasta los acuíferos, de modo que parte del hidrocarburo percolado puede haber sufrido o sufrir durante su movilización de este proceso (Rodriguez, 2018).

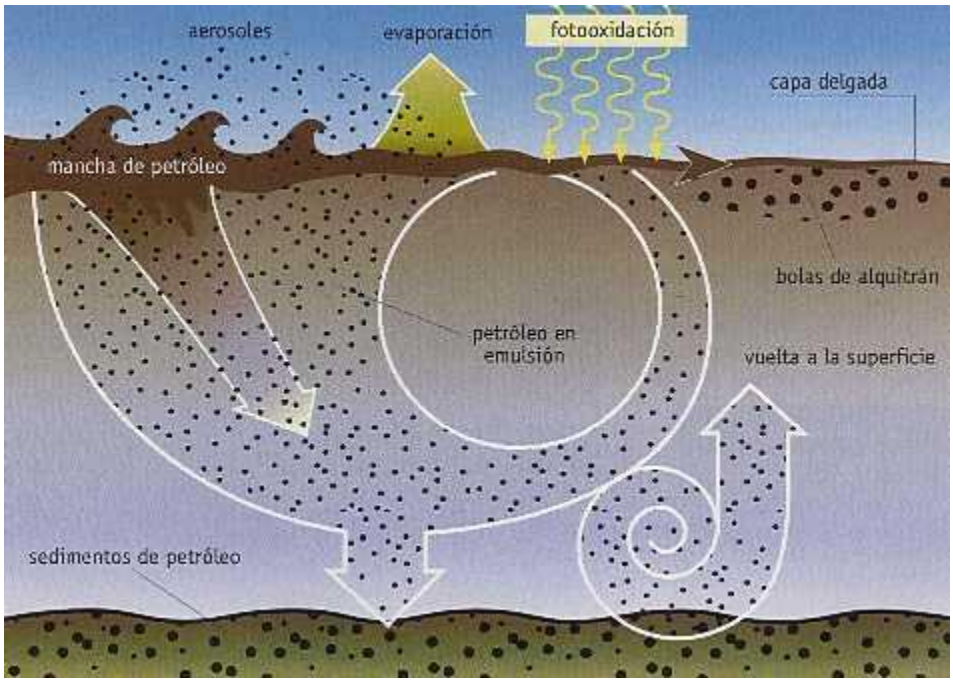



**Figura 2:** Proceso de degradación de los hidrocarburos,
**Fuente:** Ciencias de la tierra y del medio ambiente.

- **Evaporación**

  Este paso atañe la composición del producto derramado: crece su densidad y viscosidad y merma su solubilidad en el agua, reduciendo así el nivel de toxicidad del producto. En la medida que los compuestos más volátiles se evaporan, el petróleo se hace más pesado y puede llegar a hundirse. A las 24 horas casi el 40 % del petróleo se ha evaporado.

  Estos porcentajes van variando de acuerdo con el valor de viscosidad del hidrocarburo, por lo que el proceso de evaporación es muy trascendental en los derrames, especialmente si se trata de gasolinas o crudos livianos.

  La evaporación de los hidrocarburos es uno de los factores principales para determinar el destino final del derrame. Durante las primeras 24 horas la evaporación es responsable por la pérdida de los hidrocarburos de tamaño C6 a C13 (alcanos de 6 a 13 carbonos) dependiendo del tipo de hidrocarburo, aproximadamente 25"50 % de los hidrocarburos derramados pueden llegar a evaporarse.

- **Disolución**

  Este proceso empieza inmediatamente, es de largo plazo y continúa durante todo el proceso de degradación del hidrocarburo. Es de notar que los compuestos más ligeros son los más solubles en el agua y por lo tanto se convierten en los más tóxicos, por lo que es muy importante calcular su concentración, para estimar los posibles efectos tóxicos.

- **Oxidación**

  La combinación química de hidrocarburos con el oxígeno molecular contribuye a la descomposición final del petróleo. Cuanta más área expuesta exista, mayor será la oxidación y mayor la velocidad de degradación. La radiación ultravioleta solar produce la oxidación fotoquímica que puede implicar una degradación diaria del 1 % del derrame (dependiendo de la intensidad de la radiación solar).

- **Emulsificación**

  Este es el procedimiento por el cual un líquido se dispersa en otro líquido en forma de pequeñas gotitas, es decir como suspensión. La degradación de este tipo de emulsión es muy lenta y solo puede ser acelerada por la presencia de cierto tipo de bacterias dentro de la emulsión.

- **Sedimentación:**

  Puede suceder por dos mecanismos: el primero se define en la medida que el hidrocarburo se intemperiza resultando en un incremento de su densidad respecto al agua circundante y por consiguiente se hunde. El segundo ocurre por la adhesión de las partículas suspendidas en la columna de agua al petróleo. Esto sólo es importante en el mar.

### 2.2.5. Actividad petrolera

Es una de las causas directas de la destrucción de los bosques del mundo. Cada vez que se identifican reservas petroleras en algún lugar boscoso del mundo, se inicia una tragedia que empieza por la generación de conflictos entre las comunidades locales y que termina con la destrucción de los ecosistemas (Somos Sur, 2005).

#### 2.2.5.1. Contaminación de la actividad petrolera

La separación de petróleo y salmuera no es completa y una cierta cantidad de petróleo, compuestos orgánicos y gases disueltos, son descargados conjuntamente con el agua salina. Asimismo, al petróleo descargado en las formas mencionadas se añaden considerables cantidades por derrames, fugas, lavado y separación de equipos y accesorios, y otras fuentes, que tienen su origen en la mala operación de los sistemas de control. La película de petróleo que se forma en la superficie del agua interfiere con los mecanismos de transferencia de oxígeno, esencial para la vida de los peces y que también afecta a las aves al recubrir su plumaje y ocasionarles la muerte. Una parte de estos elementos son arrastrados por la corriente y depositados en las orillas,

afectando también a la vegetación ribereña, de la que depende la mayoría de las especies de peces. Película de petróleo que se forma en la superficie del agua interfiere igualmente en la acidez nafténica, contribuyente menor del petróleo crudo, mata a los peces, cuando está presente a concentraciones de 5 a 120 ppm. Pero la contaminación va más allá, porque las partículas de crudo se incorporan a los sedimentos refugios y/o alimentos de los organismos, en esta etapa intervienen fenómenos químicos y biológicos, los efectos son complejos y prolongados, incidiendo no sólo en una especie, sino que afecta a toda la cadena trófica, ocasionando un desequilibrio en el ecosistema (Elblogverde.com, 2016).

### 2.2.6. Contaminación del suelo por hidrocarburos derivados del petróleo

La dependencia que nuestra civilización tiene del petróleo ha sido la causa de la contaminación de suelos, muy extendida en los países productores y consumidores de petróleo, debido a los derrames de petróleo y sus derivados, así como al manejo indebido de los lodos procedentes de las refinerías. Los hidrocarburos del petróleo son tóxicos para los animales y el hombre ya que son mutagénicos y carcinogénicos (Flores *et al.,* 2001). La contaminación por estos compuestos se caracteriza en la mayoría de los casos, por ser muy persistente en los ecosistemas, aunque existan procesos degradativos en los que intervienen microorganismos, presentes de forma natural en los ecosistemas, que pueden ser utilizados o activados en procesos de biorremediación. En el caso del suelo, las principales consecuencias ambientales que se presentan después de un evento de contaminación por hidrocarburos son: la reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal del lugar del derrame, los cambios en la dinámica poblacional de la fauna y la biota microbiana y la contaminación por infiltración de las masas de agua subterráneas (Pardo, Perdomo, & Benavides, 2004). 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 (Ñustez, 2012).

#### 2.2.6.1. Presencia de microorganismos

La presencia de los microorganismos en un suelo afectado por la contaminación por hidrocarburos será crucial para su recuperación puesto que gran parte de las técnicas de biorremediación utilizadas para este fin se fundamentan precisamente en estos microorganismos degradadores de hidrocarburos, siendo las técnicas más exitosas en cuanto a su capacidad degradativa (Haristah & Kaushik, 2009). Se estima que la concentración mínima de microorganismos degradadores específicos de hidrocarburos para poder llevar a cabo la biorremediación del suelo es de 103 a 104 unidades formadoras de colonias (Ercoli & Galvez, 2001). En el caso de que la biomasa del suelo no sea suficiente, se pueden inocular al mismo microorganismo mediante la técnica de bioaugmentacion, que consiste precisamente en incentivar la degradación de los contaminantes del suelo con el aporte exógeno de microorganismos.

Como ya hemos mencionado, la presencia o no de microorganismos es fundamental pero también la variedad de los mismos es un factor importante que influirá en la eficacia de la descontaminación del suelo, y esto se observa en algunos trabajos donde existe una gran diferencia en el comportamiento de bacterias y hongos en suelos enmendados, frente a suelos sin aporte de material orgánico. El incremento de las poblaciones de hongos y bacterias observado al comienzo de la biorremediación en suelos enmendados y no enmendados con respecto a los suelos control sin contaminar, explica como la incorporación de hidrocarburos y enmiendas orgánicas proporciona sustancias que actúan como fuente de carbono y nutrientes para los microorganismos (Ros, Rodriguez, Garcia, & Hernandez, 2010), activando su metabolismo e influyendo positivamente en la descontaminación del suelo.

### 2.2.6.2. Adaptación de los microorganismos al medio con hidrocarburos

Son muchos y diversos los estudios que hablan de la importancia de esta capacidad de adaptación de los microorganismos a las variables condiciones del medio en el que se encuentran. Se ha observado que la diversidad microbiológica de un suelo con hidrocarburos disminuye, con la consecuente predominancia de aquellos microorganismos bien adaptados a ese tipo de contaminación (Ahn, 2006).De esta adaptabilidad depende en parte el éxito de la biorremediacion del suelo, puesto que gracias a ella los microorganismos son capaces de utilizar como fuente de energía las sustancias que se encuentren a su alcance, en nuestro caso los hidrocarburos del suelo.

La modificación en la composición de los lípidos de membrana es un importante mecanismo de adaptación de los microorganismos para poder desarrollarse con éxito en condiciones de estrés. Este hecho es debido a que las propiedades fisicoquímicas de la membrana celular como la hidrofobicidad, los enlaces Van Der Waals y Lewis, las características acido-base y las propiedades eléctricas, dependen, en parte, de la composición de los lípidos de la misma. Incluso dichas propiedades influyen directamente en la interacción que pueden tener las células bacterianas con las superficies abióticas del suelo (Bisbiroulas, 2010) como es, en nuestro caso, la interacción con los hidrocarburos del suelo. Además de este hecho, se han observado cambios en la expresión de algunas proteínas en bacterias afectadas por la contaminación por hidrocarburos en el suelo (Bastida, 2010).

Resumiendo, los mecanismos por los cuales los microorganismos se adaptan a las condiciones de un suelo contaminado con hidrocarburos son:

- Inducción y/o depresión de enzimas implicadas en la degradación de hidrocarburos.
- Cambios genéticos en los microorganismos, dando como resultado nuevas capacidades metabólicas.

- Enriquecimiento en organismos capaces de degradar los hidrocarburos. Esta capacidad de adaptarse al medio, sea cual sea el mecanismo que elijan para hacerlo, será crucial para
- el éxito de los procesos de biorremediación que queramos aplicar a los suelos contaminados.

### 2.2.7. Contaminación del agua por hidrocarburos derivados del petróleo

La contaminación de las aguas por hidrocarburos en los sistemas de almacenamiento, en las fuentes de abastecimiento subterráneas y superficiales, así como en otros emplazamientos, es un hecho que ha venido en aumento como resultado de la explotación, refinación, distribución y almacenamiento de petróleo crudo y sus derivados.
Este tipo de contaminación produce un cambio en las características del agua, pudiendo provocar en el ecosistema serios efectos debido al impacto negativo de estos contaminantes sobre sus diferentes componentes, *(*Vicente I. Prieto Díaz y Lic. Agustín Martínez 1999*)*.

En el agua, los hidrocarburos se esparcen rápidamente, debido a la existencia de una importante diferencia de densidades entre ambos líquidos, llegando a ocupar extensas áreas, y dificultando por lo tanto sus posibilidades de limpieza. Se crea una capa de unos pocos micrones de espesor lo que imposibilita la interacción entre la flora y la fauna con la atmósfera, obstruyendo así el ciclo natural de vida. Si las sustancias contaminantes alcanzan la costa, debido a la alta permeabilidad de la arena, los hidrocarburos pueden penetrar hacia el subsuelo contaminando las aguas subterráneas y dejando rastros irreparables en los reservorios de agua dulce (Plus).

### 2.2.8. Petróleo en Perú

Tres, son las zonas petroleras del Perú: la costa noroccidental, el zócalo continental y la selva peruana. La costa noroccidental del Perú es la zona petrolera más antigua del país, en el departamento de Piura. Allí están los centros petrolíferos de la Brea, Pariñas, Lobitos, El Alto, Talara y los Órganos, todos ellos en la provincia de Talara. El zócalo continental

es la parte del fondo submarino que se extiende entre a la playa y la isobata de 200 m de profundidad. Frente a Piura el zócalo continental es estrecho. Sin embargo, allí hay 539 pozos en producción que se operan desde unas plataformas flotantes. La selva peruana es la más importante zona petrolera del Perú. Su explotación se acentuó en la década del setenta. Los primeros yacimientos que se explotaron fueron: Aguas Calientes, en la provincia de Pachitea, departamento de Huánuco. En la década del setenta se descubrieron los yacimientos de la selva norte, en las cuencas de los ríos Corrientes, afluente del Tigre, y Pastaza, ubicados cerca de la zona de frontera, en el departamento de Loreto (Valderrama G. , 2005).

#### 2.2.8.1. Potencial petrolífero

Perú está ubicado en una de las zonas más productivas de Sudamérica, sin embargo, resulta ser un país en el que la actividad exploratoria no es adecuada en función al potencial de producción probable. El país tiene 18 cuencas sedimentarias con 83 millones de hectáreas (ha), la mayoría de ellas en un estado inmaduro de exploración, existen por tanto grandes posibilidades de encontrar nuevos y mejores yacimientos de petróleo. Existen 74 contratos de exploración y explotación con 33 millones de hectáreas y existe un remanente de 50 millones de hectáreas para nuevos contratos. Se estima que el Perú puede alcanzar un total de más de 4,000 millones de barriles de reservas probadas, en las cuales el mayor volumen consiste en Gas Natural y Líquidos de Gas Natural. Como resultado de nuevos descubrimientos, las reservas probadas de petróleo, gas natural gas y liquido de gas natural (LGN) se han tenido un incremento sostenido en los últimos 20 años. Siendo la región más prolífica y de mayor éxito productivo la del Sub Andina, con un factor de éxito de 77 %. El año 2014 se efectuaron importantes hallazgos en la Cuenca de Ucayali, los cuales cuentan con un excelente potencial productivo, lo que generará también el incremento del riesgo de contaminación por el derrame de petróleo, que actualmente se transporta mediante camiones cisterna en vías afirmadas no asfaltadas y

se prevé que en los próximos años se contará con oleoductos que también son susceptibles a sufrir roturas contaminando el suelo de la región (Cuneo, 2014).

### 2.2.9. La refinación del petróleo en el Perú

En el Perú la industria de refinación de petróleo está constituida por 07 Refinerías (Gráfico Nº3.1) de las cuales 05 de ellas a cargo de Petroperú S. A. son de propiedad del estado: Refinería Talara (62500 BPD), Refinería Conchán (13500 BPD), Refinería Iquitos (10500 BPD), Refinería El Milagro (1700 BPD) y refinería Pucallpa (3000 BPD); esta última arrendada y operada por Maple Gas Corporation – Perú. Entre las refinerías privadas están: Refinería La Pampilla (102000 BPD) del Grupo Repsol y Refinería Shiviyacu de propiedad de Pluspetrol (2000 BPD).




**Figura 3.** Refinería en el Perú
Fuente Ministerio de Energia y Minas

### 2.2.9.1. Refinería en Ucayali

La región Ucayali por muchos años ha sido una de las zonas de producción de petróleo, existen yacimientos en Maquia, Aguas calientes, así como la refinería Pucallpa, Petróleos de la Selva y la Planta de fraccionamiento y Planta de gas de Aguaytía y en el año 2014 se efectuaron varios pozos exploratorios confirmando la existencia de crudo de excelente calidad, lo cual originó el incremento de la actividad de producción, almacenamiento y transporte de petróleo, incrementándose

notablemente el riesgo de derrame de petróleo por la volcadura de camiones cisterna que transportan el petróleo crudo producido en la región (Rodriguez, 2018).

Refinería Pucallpa Inició sus operaciones el 11 de setiembre de 1966, se ubica en Jr. Padre Aguerrizabal N° 300, Pucallpa, Distrito de Callería, provincia de Coronel Portillo, Departamento de Ucayali. Es propiedad de Petroperú, pero, actualmente viene siendo operada por la Compañía Maple Gas Corporation del Perú – Sucursal Peruana, a través de la marca Petróleos de la Selva.

### 2.2.10. Degradación de Hidrocarburos

La degradación de Hidrocarburos consiste en captar contaminantes mediante procesos biológicos. Los procesos de remediación son in-situ (en el mismo lugar) o ex situ (separando proporción contaminada). Las faenas industriales expelen un gran contenido de contaminación con metales pesados (Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Hg, Co, Ag, Au) así como también, radionúclidos (U, Th) en el medio ambiente (Yaya, 2017).

### 2.2.11. Papel de los microorganismos en la degradación de los hidrocarburos

Las reacciones de transformación del hidrocarburo en anhídrido carbónico y agua tienen lugar en el interior de las células, por lo que es condición indispensable que los microorganismos sean capaces de captar e introducir a través de su pared celular estas moléculas para degradarlas. La naturaleza hidrofóbica de los hidrocarburos hace que sean moléculas difíciles de metabolizar por los microorganismos puesto que estos necesitan de un medio acuoso para poder operar. También es importante la longitud de las cadenas de carbonos que componen los hidrocarburos puesto que cuanto más largas sean estas cadenas menores va a ser su solubilidad en agua y por tanto menor será su biodisponibilidad al ataque microbiano. Cuanto más complejas sean las moléculas, menor será su biodegradabilidad.

También existen estudios en los que se evalúa la degradabilidad de los hidrocarburos a lo largo del tiempo. La biodisponibilidad de los hidrocarburos se reduce con el tiempo debido a un proceso de envejecimiento. Entre las posibles causas se mencionan reacciones de oxidación química que incorporan el contaminante dentro de la materia orgánica, difusión lenta dentro de los poros muy pequeños y adsorción en las paredes de los mismos, así como la formación de películas semirrígidas alrededor de los líquidos en fase no acuosa, con una alta resistencia a la transferencia de la masa en acuíferos y reactores slurry (Ercoli, y otros, 2000)

Los microorganismos juegan un papel fundamental en la degradación de los hidrocarburos siendo los principales responsables de ella, si bien es cierto que son muchos los factores que hacen posible que esto tenga lugar. En los lugares donde ha habido depósito controlado o derrame de hidrocarburos aparecen de forma natural microorganismos que utilizan estas moléculas como fuente de energía frente a otras colonias que, por un lado, son inhibidas por este contaminante, y por otro, sufren la competencia de las bacterias degradadoras de hidrocarburos.

Estas bacterias responsables de la degradación de los hidrocarburos pueden encontrarse en un ambiente dependerá también de las características del suelo; una alta capacidad de cambio catiónico y una elevada adsorción de contaminantes orgánicos tendrá como consecuencia un bajo efecto tóxico en los ecosistemas (McBride, 1994).

Como estamos viendo a lo largo de esta Memoria, el papel de los microorganismos es primordial pudiendo nosotros influir tanto negativa como positivamente en su capacidad degradativa, modificando el ambiente del lugar contaminado, aun así, los propios microorganismos han desarrollado mecanismos para solventar el problema de biodisponibilidad de los hidrocarburos y mejorar así su capacidad biodegradativa. Según algunos investigadores (Syldat y Wagner, 1987) estos mecanismos son:

- Producción por parte de los microorganismos de surfactantes iónicos que favorecen las emulsiones hidrocarburo-agua; de esta forma, los

hidrocarburos adquieren características hidrofílicas y pueden entonces atravesar la pared celular.

- Producción de cambios en la naturaleza de su pared celular, produciendo polímeros con estructura de surfactante no iónico, los cuales, adheridos a la superficie del microorganismo, vuelven a la célula lipófila y por tanto, capaz de convivir perfectamente con los hidrocarburos.

### 2.2.11.1. Microorganismos que degradan Hidrocarburos

Existen indefinidos reportes de las bacterias que participan en la degradación del petróleo tal y como se ve en la tabla siguiente (Garcia & Aguirre, 2014):

**Tabla 1:** Bacterias degradadoras de hidrocarburos

| Compuesto | Bacterias | Compuesto | Bacteria |
|---|---|---|---|
| **Alcanos** | *Acinetobacter sp.* | **Mono-aromaticos** | *Ralstonia sp.* |
| | *Actinomicetos* | | *Rhodococus sp.* |
| | *arthrobacter* | | *Pseudomonas putidas.* |
| | *Bacilus sp.* | **Poli-aromaticos** | *Altermonas sp.* |
| | *Mocrococcus sp.* | | *Arthrobacter sp.* |
| | *Planococus.* | | *Bacilus sp.* |
| | *Rhodococus sp.* | | *Mycobacterium.* |
| | *Pseudomonas sp.* | | *Pseudomonas aeruginosa.* |

**Fuente:** (Garcia & Aguirre, 2014)

### 2.2.12. Factores que condicionan la degradación de hidrocarburos

La biodegradabilidad de una mezcla de hidrocarburos presente en un suelo contaminado depende de diversos factores, los cuales como pueden clasificarse en cuatro grupos (Rodriguez, 2018)

- **Factores medio ambientales**

  Los factores medio ambientales son aquellos necesarios a la hora de proporcionar las condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos que llevan a cabo la recuperación. Los microorganismos son muy sensibles a los cambios de temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, oxígeno y humedad (Rodriguez, 2018).

- **El pH**

  Afecta significativamente la actividad microbiana. En consecuencia, cuanto mayor sea la diversidad de microorganismos existentes, potencialmente mayor será el rango de tolerancia. No existen unas condiciones preestablecidas que sean óptimas en todos los casos, pero en términos generales el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8. En general, el pH óptimo para las bacterias heterótrofas es neutro (pH 6 - 8), mientras que es más ácido para los hongos (pH 4 - 5). El pH óptimo establecido para procesos de biodegradación es neutro (pH 7,4 - 7,8) (Dibble y Bartha, 1979).

- **Temperatura**

  Es uno de los factores ambientales más importantes que afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de biodegradación. Generalmente, las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 20 y 30 ºC (condiciones mesófilas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40 ºC e inhibiéndose a inferiores a 0 ºC. Sin embargo, también se ha dado la biodegradación de hidrocarburos a temperaturas extremas: 10ºC en suelos subárticos y subalpinos (Sparrow Sparrow, 1988; Margesin y Schinner, 1997). 5ºC en suelos árticos (Whyte et al., 1999) 60ºC por una cepa termófila de Bacillus stearothermophilus aislada de un suelo contaminado con crudo de petróleo del desierto kuwaití (Sorkoh et al., 1993).

- **Humedad**

  Los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo (el rango varía en función de la técnica). Por lo anterior, la humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación, fundamentalmente en suelos superficiales afectados por oscilaciones importantes en el contenido de agua. No obstante, el nivel óptimo de humedad depende de las propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y si la biodegradación es aeróbica o anaeróbica (Rodriguez, 2018).

- **El oxígeno**

  Es el aceptor final de electrones generalmente empleado en procesos biológicos y también es necesario en determinados tipos de reacciones de oxidación – reducción catalizada por enzimas. Los microorganismos, oxidan compuestos orgánicos o inorgánicos, obteniendo así la energía necesaria para su crecimiento. El proceso de oxidación da lugar a electrones que intervienen una cadena de reacciones en el interior de la célula y, al final, deben ser vertidos en el entorno. El aceptor final de electrones es el receptor de estos y, en el caso de un metabolismo aerobio, $O_2$ es el aceptor y $H_2O$ es el producto. La mayor parte de hidrocarburos presentes en los productos petrolíferos son degradados con mayor extensión y rapidez de forma aeróbica ($O_2$ como aceptor final de electrones), ya que en ausencia de $O_2$, y en presencia de aceptores de electrones alternativos ($NO_3$ - SO42- CO2 Mn4+ y Fe3+) los hidrocarburos pueden ser degradados, pero con unas tasas de biodegradación muy inferiores a las aeróbicas (Holliger y Zehnder, 1996; Grishchenkov et al., 2000; Boopathy, 2002; Massias et al., 2003).

### 2.2.13. Degradación de las diferentes fracciones de hidrocarburos

Durante la biodegradación de petróleo se ha observado que las diferentes fracciones de hidrocarburos se asimilan a tasas de consumo variadas, como respuesta a las diferentes afinidades que presentan las bacterias hacia los compuestos disponibles, la cual dependerá de la estructura y del peso molecular. Das y Chandran (2011) por ejemplo, observaron que el orden de degradación fue: alcanos-lineales > alcanos-ramificados > aromáticos de bajo peso molecular > ciclo alcanos.

Los alcanos lineales cuando son asimilados por las bacterias son metabolizados por la ruta de la β-oxidación produciendo alcohol como intermediario (Das & Chaldran, 2011).

Los alcanos-lineales entre C10 a C24 son los primeros en consumirse debido a la baja hidrofobicidad que presentan. En estudios llevados a cabo con *Pseudomonas* se observó que consumió primero los alcanos entre C5 y C16 (Das & Chaldran, 2011), por otra parte se ha observado que entre más carbonos tenga la cadena lineal el compuesto es más hidrofóbico, volviéndolos no biodisponible a las bacterias, esto da como resultado que los alcanos de cadenas largas (>C40) se degraden en un mayor lapso de tiempo, tal y como lo observaron DeLaune y Wright (2011) en estudios llevados a cabo en humedales del Golfo de México afectados por el derrame del Deepwater Horizon.

En el caso de los monoaromáticos, se ha observado que se degradan por diferentes rutas metabólicas, dependiendo de la estructura molecular del compuesto. De los hidrocarburos que conforman el btex (Benceno-tolueno-etilbenceno y xilenos), el tolueno es el de mayor consumo bajo condiciones aerobias, sin embargo, dependiendo de las bacterias presentes en las zonas contaminadas, estas moléculas pueden seguir diferentes rutas metabólicas (figura 4). Resultados similares también se han observado en la degradación de xilenos en presencia de *Pseudomonas* sp. (McGenety, 2012).

En la degradación de los poliaromáticos se observa que la tasa de consumo disminuye conforme aumentan los anillos aromáticos. Esto se debe

principalmente a que se incrementa la hidrofobicidad y por ende no están disponibles a los microorganismos, presentando un tiempo de consumo que va desde los 16 a 126 días para el fenantreno y de hasta aproximadamente 1 400 días para el benzo[α]pireno (Salleh, Ghazali, & Rahman, 2003)

El primer paso en la degradación de los poliaromáticos es la oxidación de la molécula, para formar dihidrodioles, posteriormente los intermediarios dihidroxilados pueden sufrir un ataque enzimático en las posiciones orto o meta para formar catecol o protocatecuato, para finalmente entrar al ciclo de los ácidos tricarboxilicos (Das & Chandran, 2011)

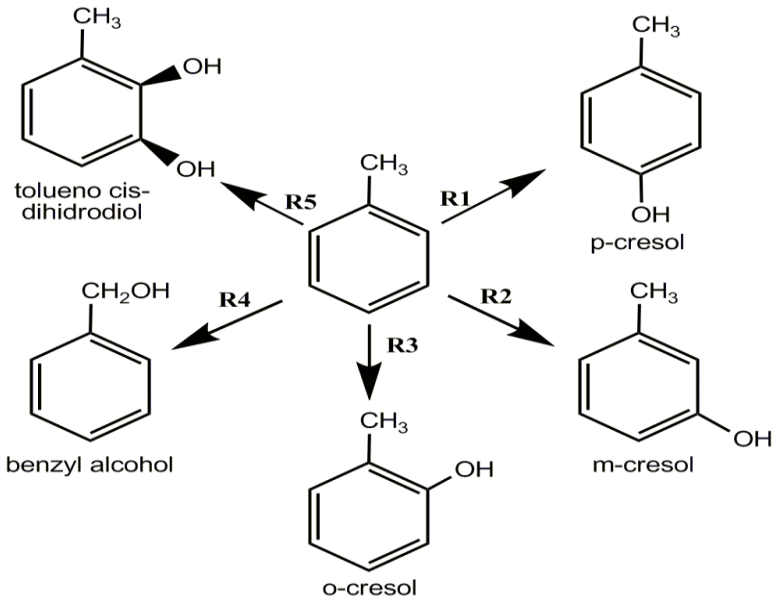



**Figura 4.** Rutas metabólicas del Tolueno por diferentes bacterias

**Fuente:** *P. mendocina* (R1), *R. pickettii* (R2), *B. cepacia* (R3), *P. putida* PaW15 (R4) y *P. putida* F1(R5) (Tomado de Salleh *et al*., 2003).

### 2.2.14. Química de la Biodegradación

La mayoría de hidrocarburos son biodegradables. La susceptibilidad a la biodegradación depende de la estructura molecular y el peso molecular, si aumentara la cadena de alcanos aumentaría la resistencia de biodegradación. No Obstante, al ramificar las cadenas reducirían la biodegradación (Yaya, 2017).

La degradación natural por bacterias es eficiente debido al metabolismo, producto de enzimas oxigenadas, las cuales agregan varios átomos de oxígenos a las moléculas por degradar (Gurdian & Johanning, 2002).

En el mecanismo de la degradación, los microorganismos al crecer en un substrato carbonoso captan como su principal fuente de energía y en donde su único alimento será el Hidrocarburo (Yaya, 2017).

### 2.2.14.1. Fundamentación bioquímica de la biodegradación

Bioquímicamente, la degradación de hidrocarburos por acción bacteriana se basa, en que a nivel de la cadena respiratoria o transportadora de electrones de las células, se van a producir una serie de reacciones oxido - reducción cuyo fin es la obtención de energía. La degradación, altera la estructura molecular de los compuestos orgánicos y el grado de alteración determina si se ha producido biotransformación o mineralización. El término biotransformación implica la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar, en tanto que la mineralización involucra una transformación total de las moléculas orgánicas en dióxido de carbono, agua, residuos inorgánicos inertes y se incorpora el resto a las estructuras de los microorganismos. En conclusión, la biotransformación es una degradación parcial y la mineralización es completa (Lagrega, Buckinghan, & Evans, 1996).

El proceso más básico del metabolismo microbiano, es la transferencia de electrones desde un sustrato donador hacia un sustrato receptor. Para la bacteria, el donador de electrones primarios será uno entre varios compuestos orgánicos contaminantes y los receptores de electrones primarios normalmente son $O_2$, $NO^{3-}$, $NO^{2-}$ ó $CO_2$ (Levin & Gealt, 1997). Así, la cadena la inicia un sustrato orgánico (el hidrocarburo) 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.

Son los microorganismos conocidos como quimioorganotróficos los encargados de utilizar estos compuestos naturales y xenobióticos

(órgano-contaminantes) como fuente de carbono y dadores de electrones para la generación de energía (Burgos, 1999).

En la práctica, si bien muchas son las bacterias capaces de degradar compuestos orgánicos, son muy pocas las que pueden degradar todo o la mayoría del compuesto. Son las asociaciones microbianas aquellas con el mayor poder biodegradativo, ya que es necesario más de un organismo para degradar la mezcla del contaminante orgánico de un área (Fristche & Hofrichter, 2004). De forma general, la actuación secuencial de una gran variedad de enzimas, que no proceden necesariamente de la misma especie bacteriana, degradaran eficientemente los residuos orgánicos a compuestos cada vez más simples (Lagrega, Buckinghan, & Evans, 1996)

Si bien la degradación de aquellos compuestos orgánicos que actúan como entes contaminadores puede darse tanto bajo condiciones aerobias como anaerobias, la más rápida y completa degradación se logra bajo condiciones aerobias. La biodegradación de compuestos orgánicos bajo condiciones aeróbicas ocurre cuando la bacteria cataliza la ruptura de moléculas en un ambiente oxigenado, obteniendo de esta manera energía química, absolutamente necesaria para los procesos metabólicos de la célula bacteriana (Enviroment Protection Agency, 1999).

Para que se produzca la degradación del sustrato, este tiene que entrar en contacto con la parte externa de la célula bacteriana. Acción que desencadena una serie de procesos metabólicos involucrados en la degradación de los residuos orgánicos (Lagrega, Buckinghan, & Evans, 1996) Tras el contacto de la bacteria con el sustrato, las enzimas extracelulares se encargan de formar complejos con las moléculas del sustrato. Estos complejos son los que permiten al sustrato atravesar la pared celular. Una vez en el interior de la célula, son las enzimas intracelulares las que formaran complejos con el sustrato para catalizar otras reacciones encaminadas a la obtención de energía y producción de nuevo material celular (Lagrega, Buckinghan, & Evans, 1996)

Para que los microorganismos puedan degradar por ejemplo los alcanos, primero deben oxidar el ultimo carbono de la molécula gracias a un complejo multienzimático que no hace más que incorporar una molécula de oxígeno (Burgos, 1999).

Frecuentemente este ataque inicial se realiza sobre un grupo metil terminal, formando un alcohol primario que, a su vez, se oxida posteriormente a un aldehído y finalmente a un ácido graso. Así, este ataque inicial de los alcanos lo realizan enzimas, las cuales presentan una necesidad estricta de oxígeno molecular: las monooxigenasas y dioxigenasas (Atlas & Bartha, 2002).En el primer caso, vale decir para la monooxigenasa, un átomo de $O_2$ se incorpora al alcano, produciendo un alcohol primario. El otro se reduce a $H_2O$, y la forma reducida del fosfato, el ($NADPH_2$) actúa como donador de electrones. Para el caso de la dioxigenasa, los dos átomos de oxigeno se integran en la molécula de alcano, produciendo un intermediario hidroperóxido inestable, que se reduce a continuación mediante el $NADPH_2$ a un alcohol y $H_2O$ (Atlas & Bartha, 2002).

Así se obtiene un hidrocarburo con un grupo alcohol, convirtiéndose en una molécula más reactiva. Mediante otras enzimas, este grupo alcohol se oxida aún más hasta la formación de un grupo aldehído y finalmente carboxilo. Así se obtiene finalmente una molécula similar a un ácido graso y puede ser degradado a Aceil-CoA por beta oxidación. Este proceso de oxidación, también puede darse en carbonos no terminales dando lugar a dos ácidos grasos que se procesaran por beta oxidación (Burgos, 1999).

Para el caso del ácido graso formado como producto final, el catabolismo de la molécula continua mediante la secuencia de la β-oxidación. Reacción que reduce la longitud del ácido graso en dos átomos de carbono; las unidades de AcetilCoA se convierten en $CO_2$ a través del ciclo tricarboxílico. De esta forma, los productos finales de la degradación de los hidrocarburos son $CO_2$ y $H_2O$ (Atlas & Bartha, 2002).

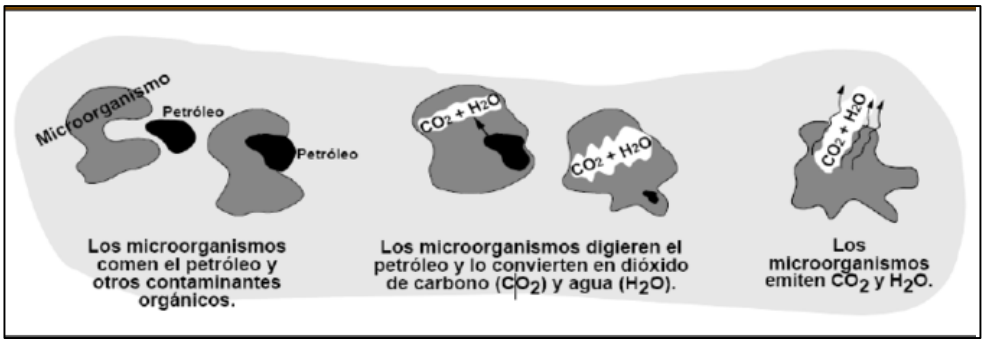



**Figura 5.** Proceso bioquímico de degradación

**Fuente:** Determinación y análisis de un proceso de biorremediación (2011)

## 2.3. DEFINICION DE TERMINOS BASICOS

### 2.3.1. Ecosistema lotico

Un ecosistema lótico es el ecosistema de un río, arroyo o manantial, en el cual el movimiento del agua es predominantemente en una dirección, siguiendo el curso que tenga el cuerpo, afectado por factores físicos como: pendiente, caudal, profundidad, sinuosidad, entre otros. Las aguas lóticas pueden tener diversas formas, del venero con unos cuantos centímetros a los grandes ríos con un cauce de varios kilómetros de ancho. El movimiento del agua en los ríos y arroyos se caracterizan por ser predominantemente un movimiento horizontal unidireccional. La compleja interacción de la biota con el ambiente físico y químico en esos sistemas es bastante influenciada por la velocidad de la corriente, que abarca la dinámica de transporte de energía y ciclo de materiales, (Tundisi, J. G.; Tundisi-Matsumura, T. São Paulo, 2008).

### 2.3.2. El agua

El agua es una substancia líquida que forma parte esencial de los seres vivos. Sin este vital líquido no puede existir la vida en el planeta. Este líquido se encuentra formado por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno y es considerado como el solvente universal, el nombre de agua proviene del latín “agua” (Laura blogspot, 2015).

### 2.3.3. Las propiedades químicas del agua

La descripción química del agua es $H_2O$, un átomo de oxígeno ligados átomos de hidrógeno. Los átomos de hidrógeno se "unen" a un lado del átomo de oxígeno, resultando en una molécula de agua, teniendo una carga eléctrica positiva en un lado y una carga negativa en el otro lado. Al agua se le llama el "solvente universal" porque disuelve más substancias que cualquier otro líquido. Esto significa que a donde vaya el agua, ya sea a través de la tierra o a través de nuestros cuerpos, lleva consigo valiosos químicos, minerales y nutrientes, el agua pura es neutral pH de 7, lo que significa que no es ácida ni básica (The Independent de 2009).

### 2.3.4. Aguas residuales

Son cualquier tipo de agua cuya calidad se vio afectada negativamente por influencia antropogénica. Las aguas residuales no son aguas limpias, pueden contener grasas, detergentes, materia orgánica, residuos industriales, agro ganaderos y sustancias toxicas, domésticas, urbanas y mineros eliminados, o las aguas que se mezclaron con las anteriores (aguas pluviales o naturales). Su importancia es tal que requiere sistemas de canalización, tratamiento y desalojo. Su tratamiento nulo o indebido genera graves problemas de contaminación (Florencia Ucha, 2012).

### 2.3.5. Refinería de petróleo

Una refinería de petróleo es una plataforma industrial destinada a la refinación del petróleo, que mediante un proceso adecuado, se obtienen diversos derivados del mismo (Gasoil, querosene, etc.).En las refinerías se empieza a tratar el petróleo en función del destino que tenga. En un horno se produce el proceso de calentamiento, donde se alcanzan temperaturas superiores a los 300 grados. Una vez caliente, el petróleo se introduce en una torre de destilación, en la cual se van separando los distintos componentes del petróleo dependiendo de su densidad para obtener sus derivados (Javier Navarro 2015).

### 2.3.6. Generalidades de las bacterias degradadoras de hidrocarburos

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos alifáticos, alicíclicos y aromáticos; se forma por procesos químicos a altas presiones y temperaturas y requiere de largos periodos de tiempo (Maposita, Fiallos, & Calle, 2010).

- **Descripción**

Se le denomina al grupo de bacterias capaces de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono; la mayoría de las bacterias conocidas hoy en día con esta capacidad fueron aisladas de zonas contaminadas como por ej. suelos cercanos a refinerías o donde se conozcan derrames de hidrocarburos (Maposita, Fiallos, & Calle, 2010).

Entre las bacterias más importantes encontramos*:*
*Pseudomonas aeruginosa, Serratia rubidae, Bacillus sp., Micrococcus sp., Brevibacterium sp., Spirillum sp., Xanthomonas., Alcaligenes sp., etc.* las cuales disminuyen la concentración de hidrocarburos presentes en el ambiente y al mismo tiempo son inocuas para la salud y el medio ambiente. Estas bacterias producen bioemulsificantes y biosurfactantes que disminuyen la tensión superficial entre el petróleo y el medio acuoso facilitando el acceso microbiano a la fuente de carbono insoluble para su degradación (Maposita, Fiallos, & Calle, 2010).

- **Usos**

Posible alternativa para la limpieza de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos (Maposita, Fiallos, & Calle, 2010).

- **Tipos de ambientes de degradación**

  Las bacterias degradadoras de petróleo pueden actúar en ambientes Aerobios o Anaerobios, y que cada caso lo hacen vía diferentes rutas metabólicas (Maposita, Fiallos, & Calle, 2010).

- **Propiedades**

  Las bacterias degradadoras de hidrocarburos poseen las enzimas necesarias para la transformación de dichos compuestos; sin embargo, también son capaces de secretar substancias bioemulsificantes y biosurfactantes que facilitan el acceso hacia el hidrocarburo. Las bacterias únicamente pueden actúar sobre hidrocarburos de peso molecular bajo.

- ***Pseudomonas aeruginosa****.*

  Es una especie de bacterias Gram-negativas, aeróbicas, con motilidad unipolar Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). Es un patógeno oportunista en humanos y también en plantas. Iglewski BH (1996). Degradadora de gran cantidad de sustratos como el n-hexadecano, mineralización de compuestos alifáticos en condiciones anaerobias, y degradadora de hidrocarburos aromáticos y poli aromáticos.

- ***Serratia rubidae.***

  Es un género de bacteria gram negativa, anaerobio facultativo, baciliforme de la familia Enterobacteriaceae. La especie más común en el género, la *Serratia marcescens*, sin embargo son capaces de degradar hidrocarburo produciendo cepas de *Serratia plymuthica, Serratia rubidaea,* raramente son causa de enfermedad por medio de infección, (Basilio J. Anía, 2007).

- ***Bacillus sp.***

  Es un género de bacterias en forma de bastón y gram positiva. El género *Bacillus* pertenece a la División Firmicutes. Son aerobios estrictos o anaerobios facultativos. Sirve también como una mejor alternativa de solución es el proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. En condiciones estresantes forman una endospora de situación central, que no deforma la estructura de la célula a diferencia de las *endoesporas clostridiales.* Dicha forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes. (Ed. Médica Panamericana, 1996, ed.1996).

- ***Micrococos sp.***

  Es un género de bacterias del Laso Actinobacteria. Se encuentran en ambientes diversos, incluyendo agua y aire. Son bacterias Gram-positivas con células esféricas de. Su genoma en guanina y citosina (GC), típicamente en cantidad del 100 al 75% de contenido GC. A menudo contienen *citoplasmass* (de tamaño comprendido entre 1 y 10MDa) que proporcionan al organismo características útiles para sobrevivir Según el estudio en la universidad López la bacteria puede durar más tiempo en el agua, por lo que le es posible degradar hidrocarburos de compuestos alcanos (Sims, E, & Konopka, 1986).

- ***Brevibacterium sp***

  Bacterias con alta capacidad degradativa de hidrocarburos es un género de bacterias del orden Actinomycetales. Son organismos de suelo Grampositivos. Es el único género de la familia Brevibacteriaceae. Brevibacterium linens está se presenta ubícuamente sobre la piel humana, causando olor corporal, (Dongying Wu et al 2009).

- ***Alcaligenes sp***

Es un género microbiológico de bacterias Gram-negativas, aeróbicas, incluidas en el orden Burkholderiales. Las especies de Alcaligenes se usan para la producción industrial de aminoácidos no estándares; A. eutrophus también produce el biopolímero polihidroxibutirato (PHB). Usado para la biodegradación de aceites compuestos poli-aromatoco, (Madigan M, 2005)

### 2.3.7. Biorremediación

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (fundamentalmente bacterias, pero también hongos y levaduras) para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples poco o nada contaminantes, y, por tanto, se puede utilizar para limpiar terrenos o aguas contaminadas (Glazer y Nikaido, 1995).

### 2.3.8. Biopelícula

Es un ecosistema microbiano organizado, conformado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas. Este tipo de conformación microbiana ocurre cuando las células planctónicas se adhieren a una superficie o sustrato, formando una comunidad, que se caracteriza por la excreción de una matriz extracelular adhesiva protectora (Harrison, Turner, Marquez, y Ceri, 2006).

### 2.3.9. Sedimentos

Es un material sólido acumulado sobre la superficie terrestre (litósfera) derivado de las acciones de fenómenos y procesos que actúan en la atmósfera, en la hidrosfera y en la biosfera. La mayoría de los procesos de sedimentación tienen lugar bajo la acción de la gravedad.

Las zonas deprimidas suelen estar sometidas a la sedimentación, mientras que las áreas más elevadas de la litosfera tienden a sufrir la erosión, (Julián Pérez & Ana Gardey, 2010).

### 2.3.10. ACPM

Se diferencia del biodiésel, que es el gasóleo extraído del aceite vegetal. En España se denomina gasóleo al combustible y diésel al motor diésel, aunque en América Latina es más común usar diésel para ambos, en Colombia se lo denomina ACPM, que son las siglas de Aceite Combustible Para Motores, (E-Cultura Group 2017).

# CAPITULO III

# METODOLOGIA

## 3.1. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

El método de la investigación fue de carácter experimental y descriptivo puesto que se quiso identificar a las bacterias degradadoras de hidrocarburos por predominación sometidas a dos tipos de cultivos. Se trabajó con bacterias provenientes del mismo ecosistema (quebrada “Anis Caño”), donde se añadió petróleo. Se aplicaron condiciones de cultivos y se verifico el cambio y las características físicas al existir bacterias en un sistema. Una vez terminado el procedimiento se seleccionó cepas bacterianas con capacidad degradadora de petróleo.

## 3.2. DESCRIPCION DEL ÁMBITO DE ESTUDIO

La ciudad de Pucallpa se ubica en el departamento de Ucayali, centro-este de Perú, a orillas del río Ucayali. Se encuentra situado en plena selva amazónica a 154 msnm. Sus tierras son arcillosas y fácilmente se disuelven y se vuelven barrosas.

Pucallpa tiene algunos relieves hidrográficos importantes. El lago Yarinacocha se ubica en el noreste y tiene muy poca superficie. El río Ucayali es el centro de comunicación y se extiende de norte a sur. Además, se conserva el caño natural de Yumantay, ubicado en la zona derecha de la avenida Centenario (distrito de Manantay).

El clima es tropical, con temperatura cálida todo el año, clasificada como clima ecuatorial según el sistema de Köppen. La temperatura promedio es de 26 °C, con picos que pueden alcanzar 37 °C en los días más calurosos. Las precipitaciones se producen entre los meses de octubre y diciembre. Durante este período, la temperatura baja hasta 21,5 °C aproximadamente. El caudal de las lluvias llega a alcanzar 1570 mm (Wikipedia, s.f.).

### 3.2.1. Ubicación del estudio

Las aguas residuales que fueron utilizadas en el presente estudio, fueron obtenidas de la quebrada que discurre por medio de la refinería MAPLE GAS CORPORATION DEL PERU S.R.L, ubicada en el Jr. Padre Aguerrizabal 260, Pucallpa 25001, distrito de Coronel Portillo. Esta empresa se encarga de refinar el petróleo crudo en la selva. Las coordenadas UTM 551567 E y 9072400 N, para el punto de la entrada de la muestra; y coordenadas UTM 551519 E, y 9072160 N, para el punto de salida de la muestra.

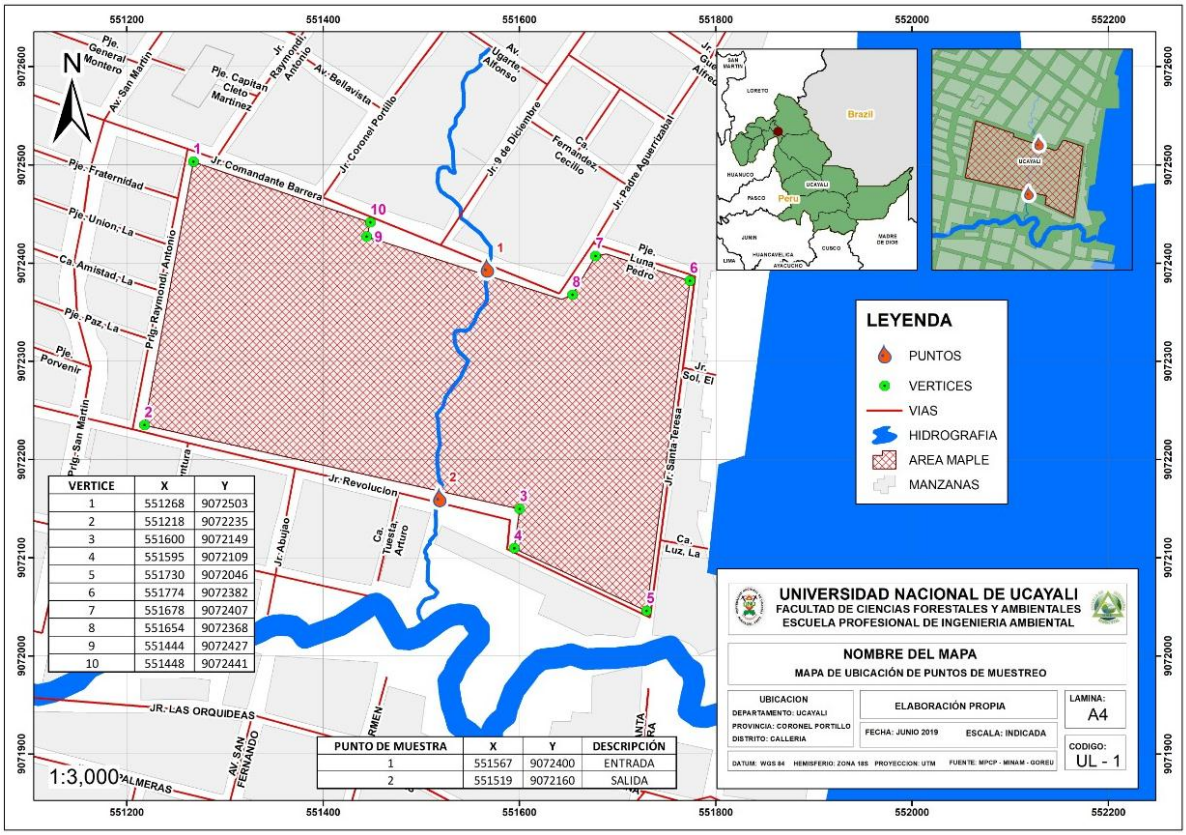



**Figura 6.** Área de estudio

### 3.2.2. Lugar de ejecución

El trabajo de investigación se realizó de acuerdo al siguiente detalle:

- En campo: Para la obtención de las muestras, estas se realizaron en la quebrada “Anis Caño” que atraviesa la refinería de la empresa MAPLE GAS CORPORATION DEL PERU S.R.L

- Laboratorio: En el laboratorio de Microbiología y Parasitología, perteneciente a la Universidad Nacional de Ucayali, de la Facultad de Ciencias de Salud, en el distrito de Callería, provincia de Coronel Portillo Departamento de Ucayali, las comunidades bacterianas fueron sometidas a petróleo crudo como parte del procedimiento de aislamiento de bacterias.

- Empresa: Para la identificación de las bacterias degradadoras, estas fueron enviadas al Laboratorio Natura, para su respectivo análisis.

## 3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

### 3.3.1. Población

Para la ejecución del proyecto se tomó el afluente y efluentes que tiene como población principal a las comunidades bacterianas en 1000 ml de agua superficial y 30 gr de sedimento de la quebrada “Anis Caño” que atraviesa la refinería de la empresa MAPLE GAS CORPORATION DEL PERU S.R.L del distrito de coronel portillo, que tiene la siguiente longitud de 249,35m de entrada a salida, que conecta con la quebrada Yumantay ubicación, a 137.99m, en afluente tenía 15.22m de ancho, 3 m de profundidad.

### 3.3.2. Muestra

Para la muestra se consideró la entrada (afluente) y salida (afluente) de la quebrada “Anis Caño” que discurre por medio de la refinería Maple (petróleos de la selva). El día 27 de febrero de 2019 a las 10:00 am, se realizó el recojo de las muestras en el punto 01 (afluente) con coordenadas 08º23'28"S, 74º31'53"W, y punto 02 (efluente), con coordenadas 08º23'36"S, 74º31'55"W, recolectándose las comunidades bacterianas presentes en el agua (55 ml) y sedimentos (15 gr), codificándose de acuerdo a la siguiente tabla:

**Tabla 2**. Códigos de muestreo

| PUNTOS DE MUESTREO | CODIFICACION |
|---|---|
| **ENTRADA** | |
| Agua superficial | A1 |
| Sedimento | L1 |
| **SALIDA** | |
| Agua superficial | A2 |
| Sedimento | L2 |

## 3.4. INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS

### 3.4.1. Materiales e instrumentos de campo

- Máquina de agitación
- Horno
- Balanza analítica
- Medidor de pH (HACH)
- Guantes quirúrgicos
- Mascarillas
- Medidor de temperatura
- Autoclave
- Pipeta graduada
- Micro pípeta
- Pipeta desechable
- Controlador de pipeta
- Baso precipitado
- Probeta graduada
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Barilla
- Placas petri
- Espátula drigalsky
- Espátula

- Mechero
- Caldo nutritivo
- Agar nutritivo
- Agar-agar 15 g/l
- Caldo de pre-enriquecimiento $(NH_4)H_2PO_4$(0.9mg/L) marca R.A. Chemicals
- ACPM
- Caldo de enriquecimiento marca Merck
- $K_2HPO_4$: 1.5 g/l
- $KH_2PO_4$: 0.5 g/l
- $(NH_4)_2SO_4$: 0.5 g/l
- NaCl: 0.5 g/l
- $MgSO_4$: 3.0 g/l
- $FeSO_4$: 0.002 g/l
- $CaCl_2$: 0.002 g/l

### 3.4.2. Materiales y equipos de gabinete

- Laptop
- Cámara fotográfica
- Multiparametro marca HANNA – HI9813-6
- Multiparametro marcas HANNA-HI 9146
- Materiales de escritorio (papel bond, USB, etc.)
- Software de base de datos y procesamiento de texto (MS Word, MS Excel).

### 3.4.3. Recolección de datos

- Fichas de muestreo
- Fichas de recolección de datos

## 3.5. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE DATOS

### 3.5.1. Obtención y acondicionamiento de muestras

Para el análisis de las muestras se procedió de la siguiente manera:

- Agua Superficial

  Se tomaron dos (02) muestras de 550 ml de agua residual, la primera muestra de la entrada (afluente) y la segunda muestra de la salida (efluente) respectivamente, del caño que discurre por medio de la refinería MAPLE GAS CORPORATION DEL PERU S.R.L, y conectan con la quebrada Yumantay, en frascos de vidrio transparentes que fueron utilizados, previamente codificada como A1 y A2

- Sedimentos

  Se tomaron dos (02) muestras de 15 gr de lodo, la primera muestra de la entrada (afluente) y la segunda muestra de la salida (efluente) respectivamente, de la quebrada que discurre por medio de la refinería MAPLE GAS CORPORATION DEL PERU S.R.L, y conectan con la quebrada Yumantay, en frascos de vidrio transparentes que fueron utilizados, previamente codificada como L.01 y L.02

Posteriormente las muestras fueron transportadas en un cooler separados a 2cm de las otras a una temperatura de 18ºC, al Laboratorio de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Ciencias de salud, de la Universidad Nacional de Ucayali, donde se realizó la fase de pre-enriquecimiento y de enriquecimiento.

Una vez transportadas las muestras al laboratorio de microbiología parasitología de la Universidad Nacional de Ucayali a condiciones normales de temperatura, pH y oxígeno, se procedió al proceso de inoculación por un periodo de 7 días.

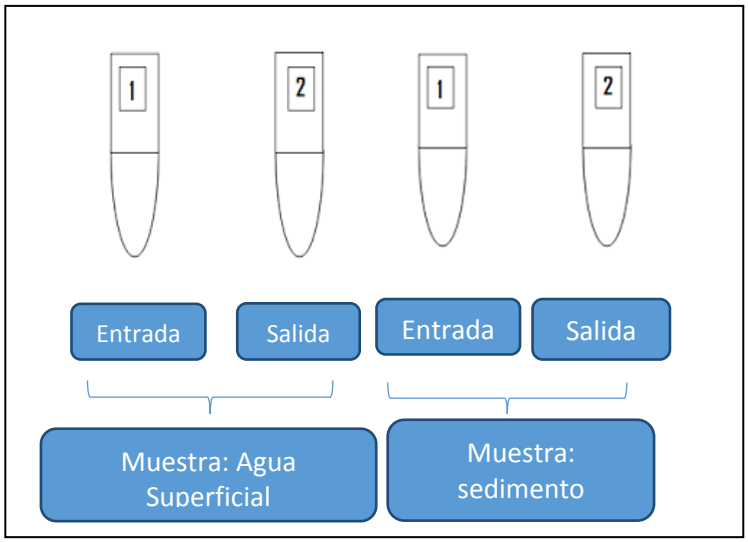



**Figura 7**. Recolección de muestras

#### 3.5.1.1. Medición de parámetros fisicoquímicos

Para el análisis de las condiciones in situ de las muestras de agua superficial y sedimentos, se procedió a la medición de los parámetros fisicoquímicos con el equipo Multiparametro marca HANNA – HI 9813-6 y Multiparametro marca HANNA- HI 9146. (pH, temperatura y oxígeno disuelto)

### 3.5.2. Crecimiento de microorganismos degradadores

#### 3.5.2.1. Etapa Pre-enriquecimiento

- **Medios de cultivo y reactivos**

Se utilizó caldo nutritivo, agar nutritivo y agar-agar comerciales marca Merck, y se prepararon según las instrucciones del fabricante. El caldo de pre – enriquecimiento se preparo con $(NH_4)$ $H_2PO_4$ (0.9mg/L) marca R.A. Chemicals, agregando ACPM al 1% (Echeverri, Manjarrez, & Cabrera, 2010).

Los componentes del caldo de pre – enriquecimiento se presentan en el anexo 1. En un frasco de dilución de 1 litro se añadieron los siguientes componentes a 495 ml de agua destilada: 1) 0.45 g fosfato monoamónico; 2) 5 ml de APCM.

Dicho medio fue colocado en 55 tubos de ensayos cada uno con 9 ml de caldo de pre – enriquecimiento. Los medios fueron esterilizados en autoclave durante 50 minutos a 20 libras de presión a 120°C, para garantizar completa esterilidad, después se dejó reposar unos 10 minutos para luego llevarlas a refrigeración por 24 horas.

- **Inoculación**

Luego de haber pasado las 24 horas se realizaron los inóculos.

- Agua superficial

  Se tomó 1mL de la muestra y se agregó a 9mL de caldo de pre–enriquecimiento que contiene 0.45 g fosfato monoamónico y 5 ml de APCM al 1%. Finalmente, se lo dejo en la máquina de agitación (baño maria) por 7 días a una temperatura de 34.5°C (Echeverri, Manjarrez, & Cabrera, 2010).

- Sedimento

  Se diluyo 5gr de sedimento en 100mL de agua destilada, con agitación por 15 minutos. 1mL de la dilución anterior se agregó en 9 ml de caldo de pre – enriquecimiento que contiene 0.45 g fosfato monoamónico y 5 ml de APCM al 1% (Echeverri, Manjarrez, & Cabrera, 2010). Finalmente, se lo dejo en la máquina de agitación (baño maria) por 7 días a una temperatura de 34.5°C.

Concluido los 7 días de incubación con el caldo de pre-enriquecimiento se seleccionaron los tubos con mayor presencia de microorganismos obteniéndose de los 55 tubos 21 distribuyéndose de la siguiente manera:

- Agua superficial
  - A1: Cinco (05) muestras positivas (+);(nueve(09) muestras negativas

- A2: Cinco (05) muestras positivas (+);(nueve(09)muestras negativas(-).

- Sedimentos
  - L1: Cinco (05) muestras positivas (+);nueve(09) muestras negativas

  - L2. Seis (06) muestras positivas (+); siete (07) muestras negativas (-).

### 3.5.2.2. Etapa de enriquecimiento

- **Medios de cultivo y reactivos**

El caldo de enriquecimiento se preparó con sales grado reactivo marca Merck, $K_2HPO_4$: 1.5 g/l; $KH_2PO_4$: 0.5 g/l; $(NH_4)_2SO_4$: 0.5 g/l; NaCl: 0.5 g/l; $MgSO_4$: 3.0 g/l; $FeSO_4$: 0.002 g/l; $CaCl_2$: 0.002 g/l, todos en 1.000mL de agua destilada, suplementados con crudo de petróleo al 1% (Echeverri, Manjarrez, & Cabrera, 2010).

Los componentes del caldo de enriquecimiento se presentan en el anexo 2. En un frasco de dilución de 1 litro se añadieron los siguientes componentes: 1) 1.5g/L fosfato dipotásico; 2) 0.5 g/L fosfato de monopotasio; 3). 0.5g/L Sulfato de amonio; 4) 0.5g/L cloruro de sodio; 5) 3.0g/L sulfato de magnesio; 6) 0.002g/L sulfato ferroso; 7) 0.002g/L cloruro de calcio, todos en 1.000mL de agua destilada, suplementados con crudo de petróleo al 1% (Echeverri, Manjarrez, & Cabrera, 2010).

La fase de enriquecimiento constó de un proceso de tres semanas. Inicialmente, pasados 7 días de incubación de las muestras pre–Enriquecidas, se tomó 1 ml de estas y se sembraron cada uno en tubos con caldo de enriquecimiento (caldo mineralizado + 1% de petróleo crudo). Se incubaron a 37°C por 7 días con agitación continua. Este mismo procedimiento se realizó a los 14 y a los 21 días (Echeverri, Manjarrez, & Cabrera, 2010).

Al finalizar los 21 días de la etapa de enriquecimiento se seleccionaron los tubos con mayor turbiedad obteniéndose las siguientes muestras:

- Agua superficial
  - A1: cinco (05) muestras más tres (3) clonadas; total ocho (08) muestras;
  - A2: cinco (05) muestras más tres (03) clonadas; total ocho (08) muestras

- Sedimentos
  - L1: cinco (05) muestras; más dos (02) clonadas; total siete (07) muestras;
  - L2: seis (06) muestras más uno (01) clonadas; total siete (07) muestras

### 3.5.3. Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos

- **Medios de cultivo y reactivos**

El medio mineralizado sólido se obtendrá agregando agar-agar 7.5 g/L, con 1% de ACPM. Los medios fueron esterilizados en autoclave por 50 minutos a 20 libras de presión y 121°C, para garantizar completa esterilidad (Echeverri, Manjarrez, & Cabrera, 2010), después se dejó reposar unos 10 minutos, para luego servirlo en placas Petri de 15 x 100 mm forma redonda.

Para el aislamiento de las bacterias se tomó 1ml de las muestras obtenidas en la etapa de enriquecimiento sembrándose en 24 placas Petri con el medio mineralizado de agar, estas fueron incubadas a 37°C por 7 días.

### 3.5.4. Identificación bioquímica

Para la identificación bioquímica se consideró lo obtenido del proceso de la etapa de enriquecimiento, reconociéndose los tubos de muestras con mayor turbiedad, para lo cual se seleccionó las siguientes cantidades:

- Agua superficial
  - A1: Seis (06) muestras;
  - A2: Seis (06) muestras
- Sedimentos
  - L1: Seis (06) muestras;
  - L2: Seis (06) muestras

## 3.6. PROCESAMIENTO PARA RECOLECCIÓN DE DATOS

### 3.6.1. Crecimiento de microorganismos degradadores

#### 3.6.1.1. Etapa Pre-enriquecimiento

En esta etapa de 55 tubos con caldo de Pre-enriquecimiento, las cantidades de muestras se presentan según la siguiente tabla:

**Tabla 3.** Cantidad de muestras

| *Caldo Pre-enriquecimiento* | *Muestras de Entrada (Afluente)* | | *Muestras de Salida (efluente)* | |
|---|---|---|---|---|
| | *Cantidades* | | | |
| | **A1** | **L1** | **A2** | **L2** |
| ***55 tubos*** | 14 tubos | 13 tubos | 14 tubos | 14 tubos |

Asimismo, para su identificación se procedió con la siguiente codificación:

**Tabla 4.** Codificación de muestras

| **Muestras** | **Codificación** |
|---|---|
| A1 | *1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14* |
| L1 | *1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13* |
| A2 | *1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14* |
| L2 | *1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14* |

De los 55 tubos con caldo de pre-enriquecimiento se seleccionaron un total de 21 tubos de las muestras A1 (*2; 5; 8; 11; 14*), L1 (*1; 4; 6; 10; 11*), A2 (*1; 3; 7; 8; 13*) y L2 (*2; 3; 5; 9; 12; 13*) con la siguiente numeración:

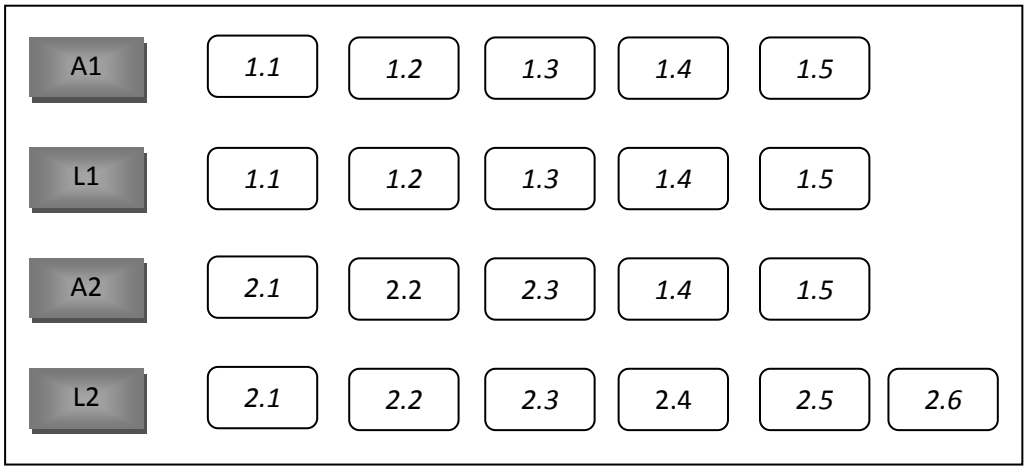



**Figura 8.** Selección de muestras de Pre-enriquecimiento

### 3.6.1.2. Etapa de enriquecimiento

De los 21 tubos obtenidos de la etapa de pre-enriquecimiento, se procedió con la selección de los tubos con mayor turbiedad considerándose para el caldo de enriquecimiento sub muestras consiguiéndose un total de 30 tubos de ensayo, con la siguiente numeración:

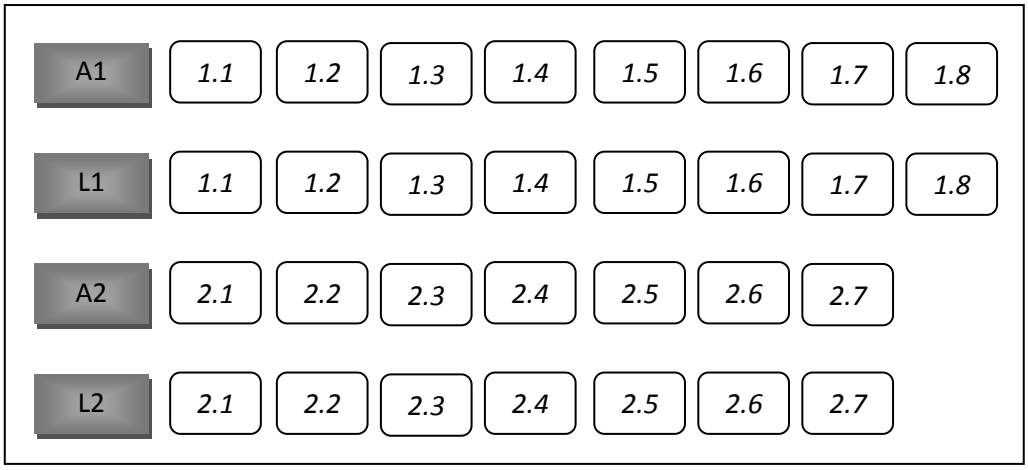



**Figura 9.** Selección de muestras de Enriquecimiento

### 3.6.2. Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos

Para el aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos de los 30 tubos conseguidos en la etapa de enriquecimiento según turbiedad de las muestras solo se sembraron 24 de estas en placas Petri establecidas con el siguiente código:

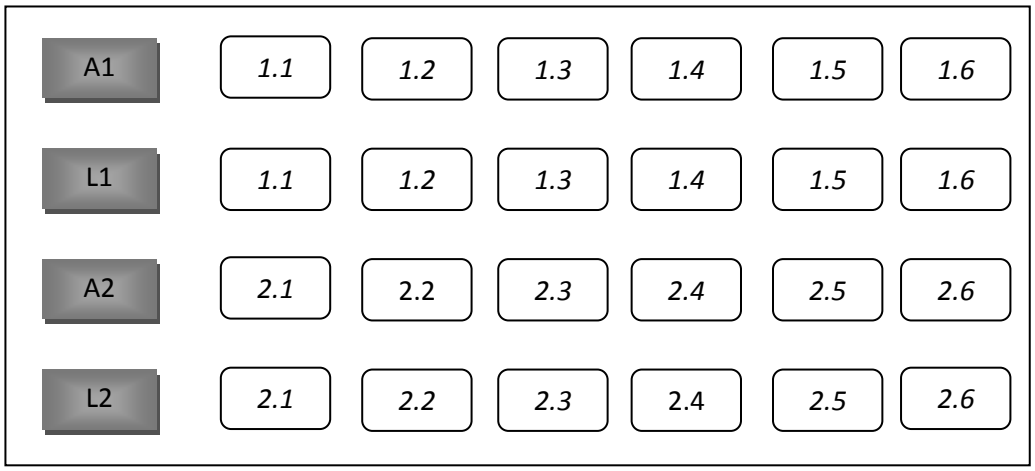



**Figura 10.** Selección de muestras para aislamiento

### 3.6.3. Identificación bioquímica

Todos los tubos fueron repicados en agar nutritivo y las cepas caracterizadas bioquímicamente. El procedimiento se realizó de acuerdo con las especificaciones técnicas de la casa comercial.

Para la identificación bioquímica de las cepas se utilizaron pruebas bioquímicas las cuales consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, permite identificar distintos microorganismos presentes. Su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no (Madigan, Martinko, & Parker, 2000).

En este caso se a partir de cada cepa aislada se sembraron pruebas bioquímicas de Catalasa, Citrato, LIA (Lisina, Hierro Agar), y TSI (Triple Azúcar Hierro) para determinar el metabolismo de los microorganismos aislados.

## 3.7. TRATAMIENTO DE DATOS

Para la identificación bioquímica de las bacterias, las muestras fueron llevadas al laboratorio Natura Analítica SAC, analizándose un total de 24 muestras. Utilizando los medios de cultivos AGAR CETRIMIDE y el AGAR MC CONKEY, se identificó las cepas con mayor desarrollo bacteriano.

# CAPITULO IV

# RESULTADO

## 4.1. Tipos de bacterias identificadas

En la identificación bioquímica de las 24 cepas bacterianas seleccionadas de las muestra de agua superficial y sedimentos se verifico la existencia del género bacteriano *Pseudomonas aeruginosa* con un 58,3% (14 tubos), con un 20,8% (5 tubos) del género bacteriano *Acinobacter sp*., 8,3% (2 tubos, respectivamente) del género bacteriano *Enterobacter sp.* y *Serratia sp.*, y con 4,2% (1 tubo) del género bacteriano *Citrobacter sp*., como se muestra en la siguiente figura.

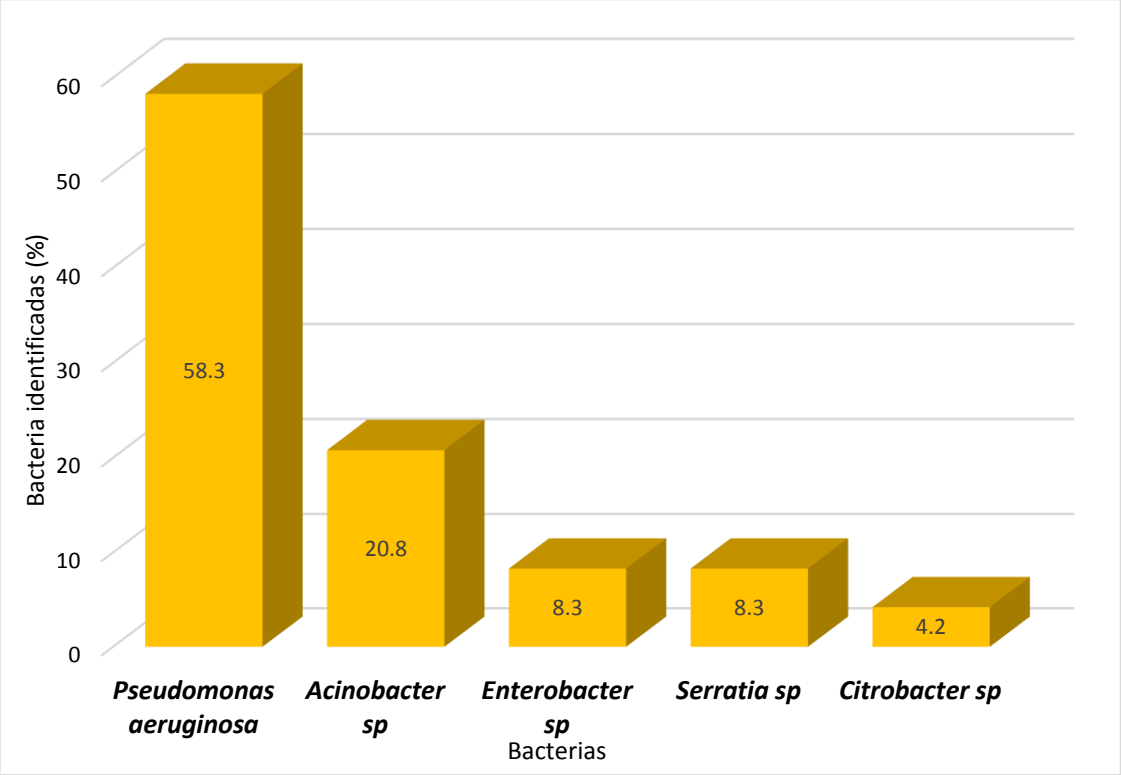



**Figura 11.** Porcentaje de bacterias identificadas.

A partir de las diferentes muestras de sedimento y agua superficial de la quebrada, se aislaron e identificaron 5 colonias de bacterias especificas capaces de crecer en presencia de petróleo (tabla 5), para ello se realizaron test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales,

conocida su reacción, permitieron identificar distintos microorganismos presentes.

**Tabla 5.** Identificación de especies y/o géneros de bacterias

| Nº | Código | *Pseudomonas aeruginosa* | *Serratia sp* | *Enterobacter sp* | *Citrobacter sp* | *Acinetobacter sp* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | L1 *1.3* | X | | | | |
| 2 | L1 *1.1* | X | | | | |
| 3 | L1 *1.4* | X | | | | |
| 4 | L2 *2.1* | X | | | | |
| 5 | L2 *2.4* | X | | | | |
| 6 | L2 *2.6* | X | | | | |
| 7 | A1 1.4 | X | | | | |
| 8 | A1 1.6 | X | | | | |
| 9 | A1 1.5 | | X | | | |
| 10 | A2 2.1 | | X | | | |
| 11 | A2 2.5 | X | | | | |
| 12 | A2 2.3 | X | | | | |
| 13 | A1 1.1 | X | | | | |
| 14 | A1 1.2 | X | | | | |
| 15 | A1 1.3 | X | | | | |
| 16 | A2 2.6 | | | X | | |
| 17 | A2 2.4 | | | | X | |
| 18 | A2 2.2 | | | X | | |
| 19 | L1 1.3 | | | | | X |
| 20 | L1 1.2 | | | | | X |
| 21 | L1 1.1. | | | | | X |
| 22 | L2 2.5 | | | | | X |
| 23 | L2 2.3 | | | | | X |
| 24 | L2 2.2 | X | | | | |

Su sistema de funcionamiento generalmente consistió en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no. En este caso se realizó la Prueba LIA (Descarboxilación Lisina), la Prueba TSI (Agar con azúcar triple y hierro), Prueba de citrato y lactosa, detallados en la figura 21(anexo).

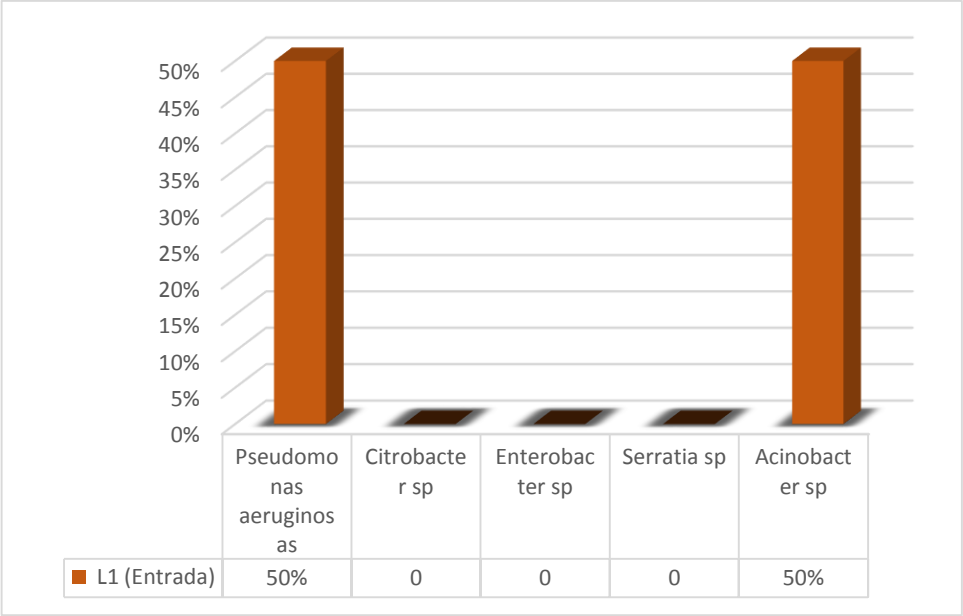



**Figura 12**. Bacterias Identificadas en muestras de sedimento L1 (Entrada)

De la identificación bioquímica de la muestra, en la figura (22)., de los 6 tubos de ensayo con muestras de sedimentos (L1), se observa presencia de dos (02) de las cinco (05) bacterias identificadas, y que estas presentan igual porcentaje (50%) de *Pseudomona aeruginosas* y *Acinetobacter sp*

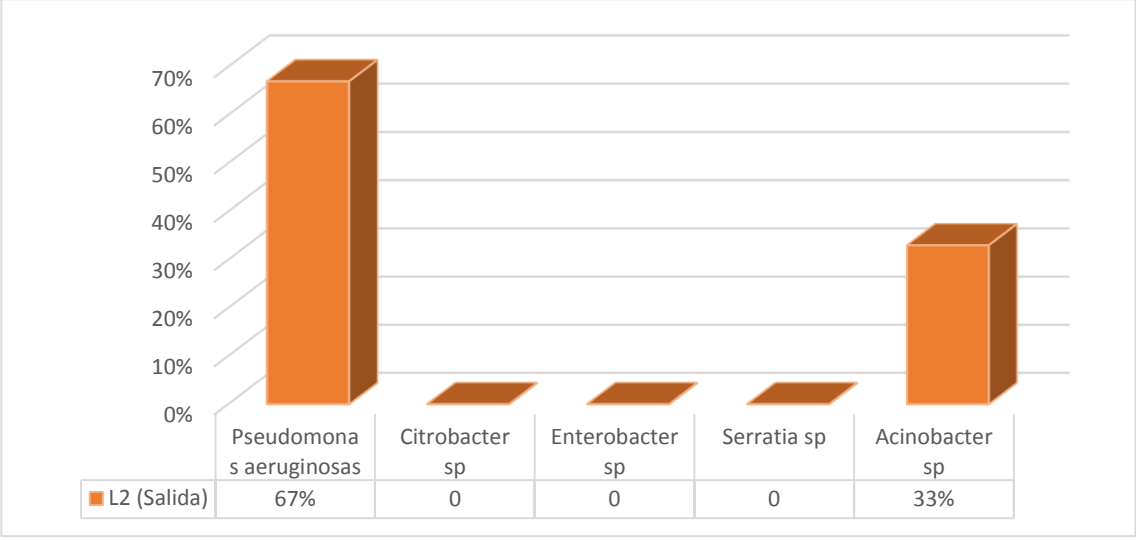



**Figura 13.** Bacterianas identificas en muestras de sedimento L2 (salida).

De la identificación bioquímica de las muestras, en la figura (23). De los 6 tubos de ensayo con muestras de sedimentos (L2), se evidencio

presencia de dos (2) de las cinco (05) bacterias identificadas, en 4 tubos de ensayo predominaron *Pseudomona aeruginosas* que representan un (67%) y (33%) *Acinetobacter sp* representan los tubos de ensayo restantes.

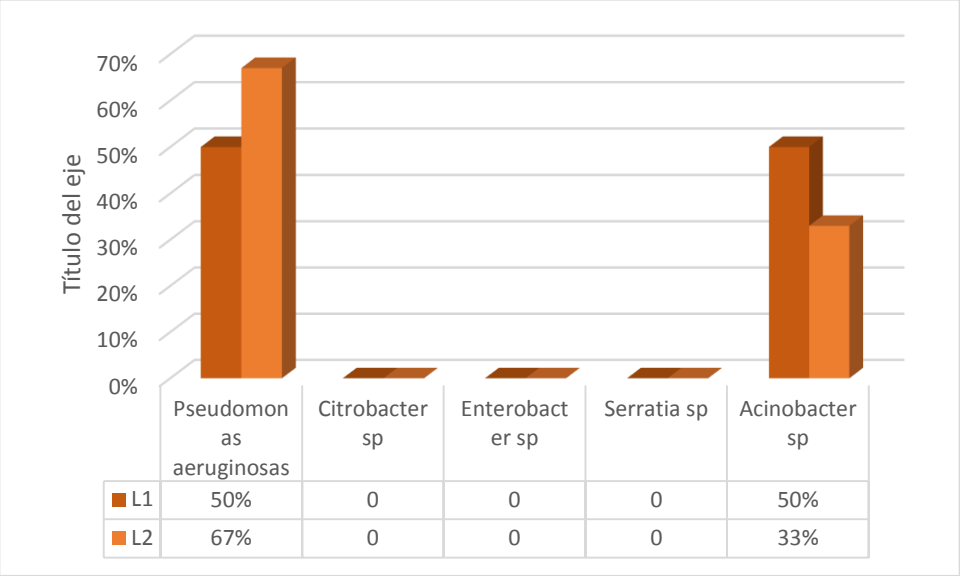



**Figura14.** Bacterias identificadas en muestras de sedimentos L1 (Entrada)- L2 (salida)

De la identificación bioquímica de las muestras de sedimento, en la figura (22- 23). Se observa que para el total de los 12 tubos de ensayo de muestra de L1 (entrada) y L2 (salida) se evidencio presencia de dos (02) de las cinco (05) bacterias identificadas, predominando en 7 tubos de ensayo *pseudomona aeruginosas* representado L1 (entrada) un 50% y L2 (salida) 67%, y en 5 tubos de ensayo en L1 (entrada) representa un 50% y L2 (salida) representa un33%.

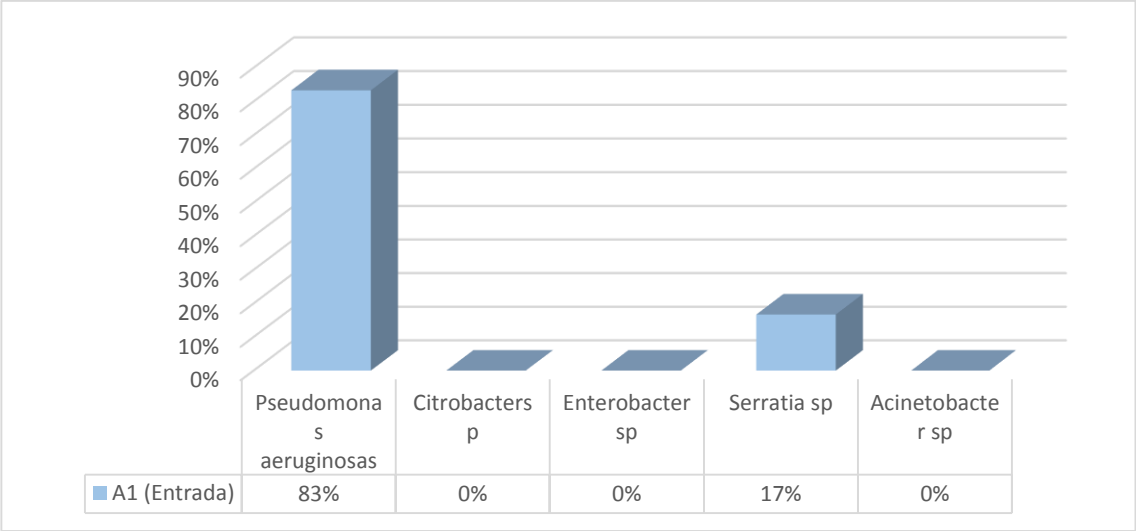



**Figura 15.** Bacterias identificadas en muestras de agua superficial A1 (entrada)

De la identificación bioquímica de las muestras, en la figura (24), de los 6 tubos de ensayo con muestras agua superficial (A1) se evidencio presencia de dos (02) de las cinco (05) bacterias identificadas, predominando en 5 tubos de ensayo el género bacteriano *Pseudomona aeruginosas* representado un (83%) y un (17%) de *serratia sp* en 1 tubo de ensayo.

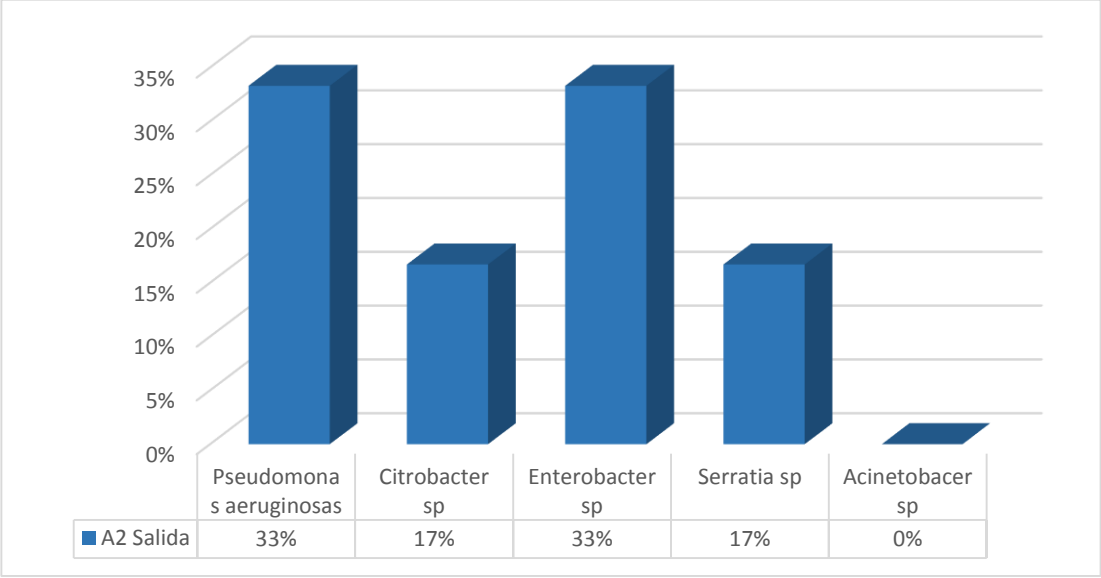
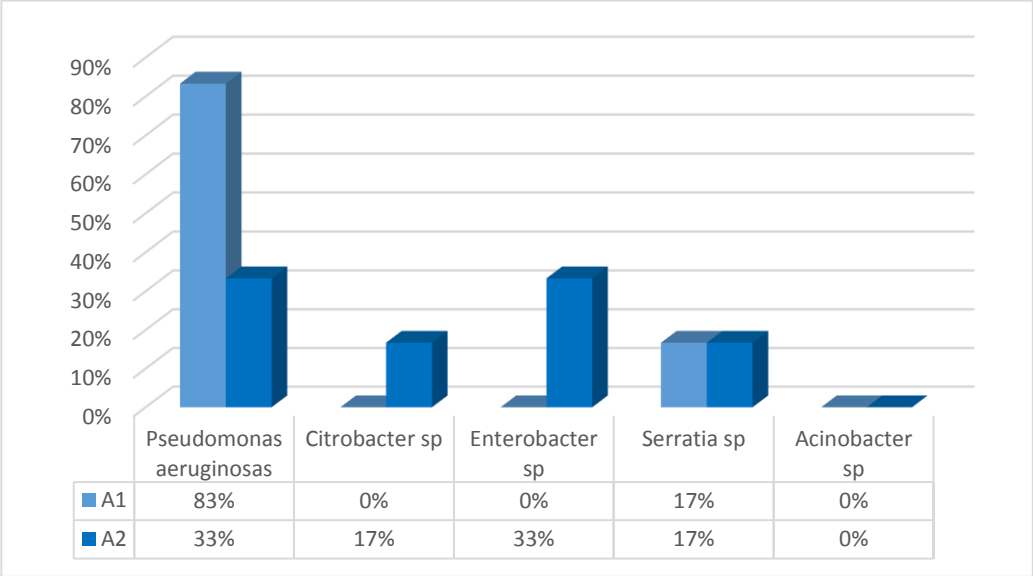



**Figura 16.** Bacterias identificadas en muestras de agua superficial A2 (salida)

De la identificación bioquímica de las muestras, en la figura (25). De los 6 tubos de ensayo con muestras de agua superficial (A2) se evidencio presencia de cuatro (04) de los cinco (05) bacterias identificadas,

predominando en 2 tubos de ensayo *Pseudomona aeruginosas* representado un (33%), en 1 tubo de ensayo *Citrobacter sp* con un (17%), en 2 tubos de ensayo *Enterobacter sp* con un (33%) y en 1 tubo de ensayo *Serratia sp* con un (17%).




| | Pseudomonas aeruginosas | Citrobacter sp | Enterobacter sp | Serratia sp | Acinobacter sp |
|---|---|---|---|---|---|
| A1 | 83% | 0% | 0% | 17% | 0% |
| A2 | 33% | 17% | 33% | 17% | 0% |

**Figura 17.** Bacterias identificadas en muestras de agua superficial A1 (entrada) – A2 (salida)

De la identificación bioquímica de las muestras, en la figura (24-25). Se observa que para el total de los 12 tubos de ensayo de muestras de agua superficial A1 (entrada) y A2 (salida) se evidencio presencia de cuatro (04) de las cinco (05) bacterias identificadas, predominando en 7 tubos de ensayo *Pseudomona aeruginosas* representando A1 (entrada) un 83% y A2 (salida) 33%, en 1 tubo de ensayo en A2 (salida) predominó *Citrobacter sp* con un (17%), en 2 tubos de ensayo A2 (salida) predomino *Enterobacter SP* con un (33%) y en tubo de ensayo tanto como en A1 (entrada) y A2(salida) predomino *Serratia sp* con un (17%)

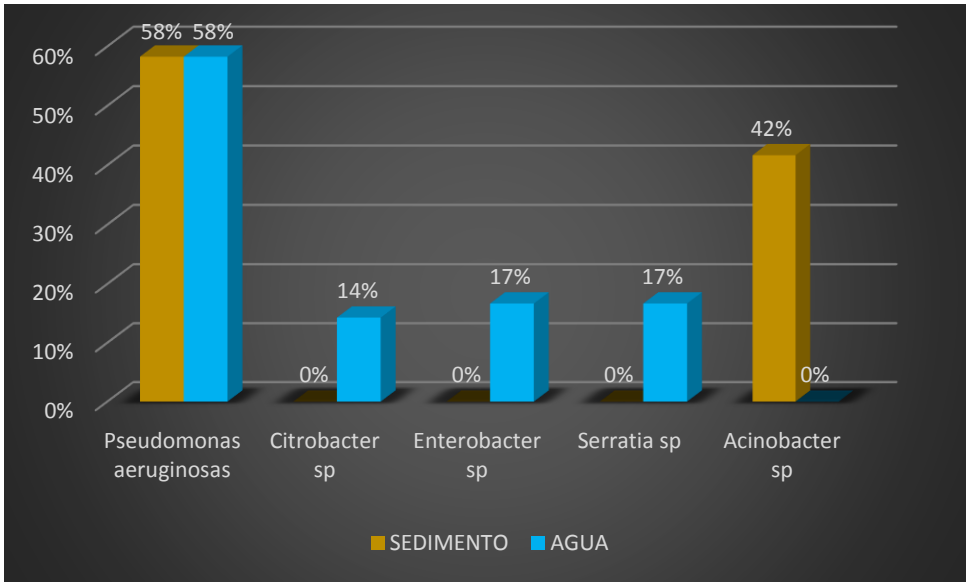



**Figura 18.** Bacterias identificadas en muestras de sedimento yagua superficial.

Se puede observar que las bacterias del genero *pseudomonas aeruginosa* de las muestras de agua superficial presenta igual porcentaje de 58% que las muestras de sedimento.

En las muestras de agua superficial, el género bacteriano *Citrobacter sp* tiene un porcentaje de 14% mientras que de muestra de sedimento 0%, para el género bacteriano *Enterobacter sp* en la muestra de agua superficial presenta un 17% y las muestras de sedimento 0%, del mismo modo en el género bacteriano *Serratia sp*, no obstante, del genero bacteriano *Acinetobacter sp* las muestras de sedimento tiene un 42% y las muestras de agua superficial 0%.

Los resultados de la identificación bioquímica de las cepas seleccionadas se obtuvieron de las distintas etapas que se dieron con anterioridad para el crecimiento de bacterias, las cuales se detallan:

- **Etapa de Pre-enriquecimiento**

  En la etapa de pre-enriquecimiento para las muestras de agua superficial se comenzó a advertir a partir del quinto día crecimiento bacteriano y que el petróleo se había disminuido y fragmentado, sin embargo, en las muestras de sedimento el crecimiento bacteriano, la disminución y fragmentación de petróleo se comenzó a observar a partir del tercer día.



**Figura 19.** Muestras en la etapa de pre-enriquecimiento

De los 55 tubos con caldo de pre-enriquecimiento, divididos en 14 tubos de la muestra A1 (Agua superficial - afluente) y 13 tubos de las muestra L1 (sedimento – afluente), resulto 35.7 % (5 tubos) y 38.5 % (5 tubos) respectivamente; asimismo de la muestra A2 (Agua superficial - efluente) se dividieron en 14 tubos y de la muestra L2 (sedimento – afluente), resulto 35.7 % (5 tubos) y 42.8 % (6 tubos) respectivamente.

- **Etapa de enriquecimiento**

  En esta etapa, la adaptación se fortalece al hacer repiques semanales por 21 días utilizando crudo de petróleo como fuente de carbono y energía (Echeverri, Manjarrez, & Cabrera, 2010). Se observó crecimiento bacteriano y que el petróleo disminuyo, con una cobertura lechosa en la superficie con floculos a simple vista.

  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.

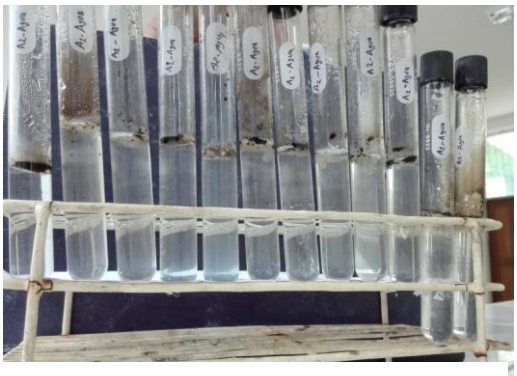


**Figura 20.** Muestras de agua superficial en la etapa de enriquecimiento

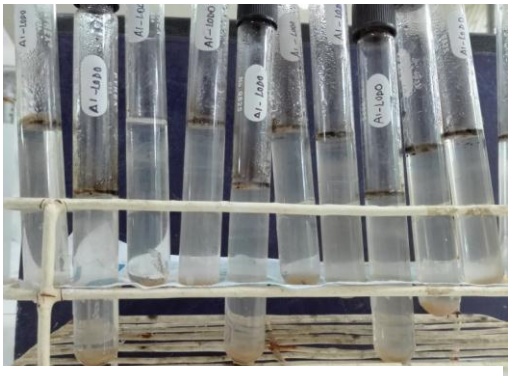


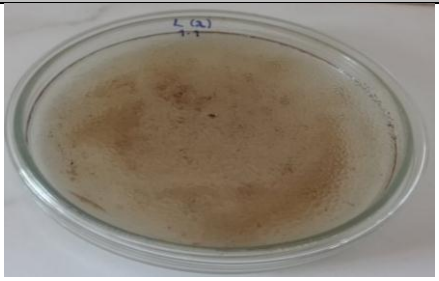
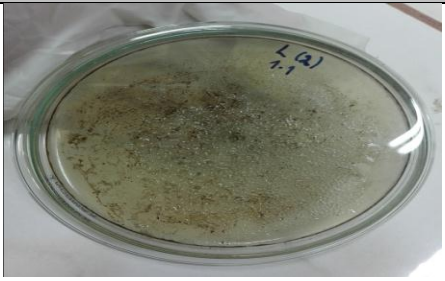
**Figura 21.** Muestras de sedimento en la etapa de enriquecimiento

- **Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos**

Del total de 30 tubos de muestras de agua superficial y sedimentos seleccionados para la etapa de enriquecimiento, se consideraron para la fase de aislamiento 24 tubos de las muestras A1, L1, A2 y L2, de cuales se escogieron las muestras con códigos 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, respectivamente.

Del aislamiento de las pruebas en placas Petri, al realizar el seguimiento de cambios se evidenció turbidez y cambios en las propiedades del crudo de petróleo. Las placas se incubaron en una estufa a 37 °C, al cabo de 7 días se observó la formación de colonias.

Los resultados obtenidos de las muestras de Agua Superficial y sedimentos antes y después de incubación, se presentan a continuación:

| ANTES | DESPUES |
|---|---|
|  |  |

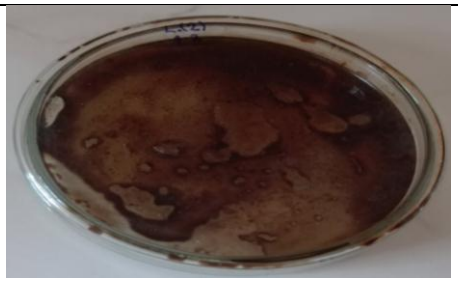
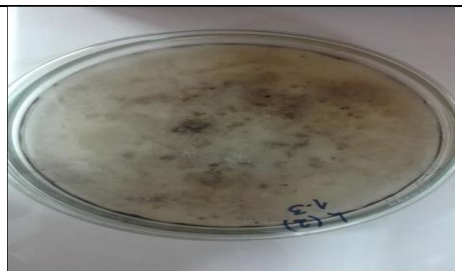
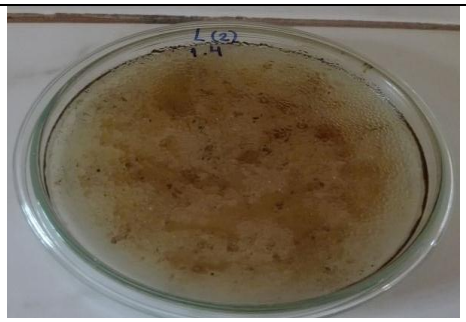
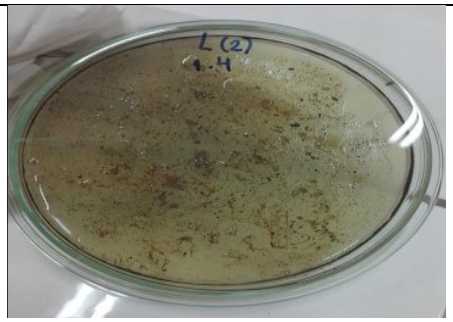
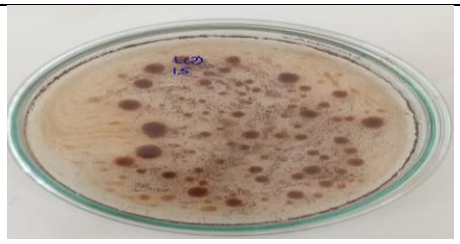
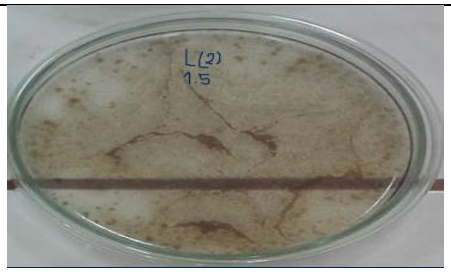
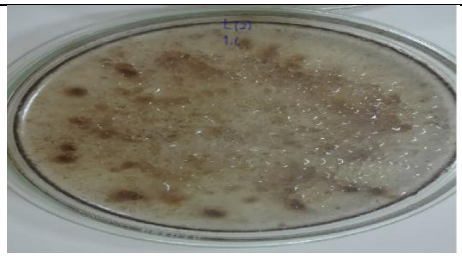
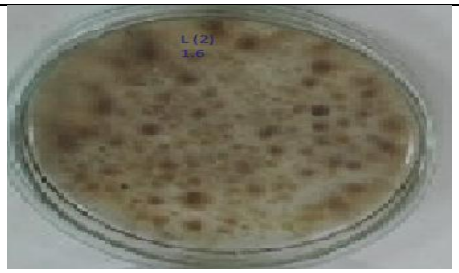
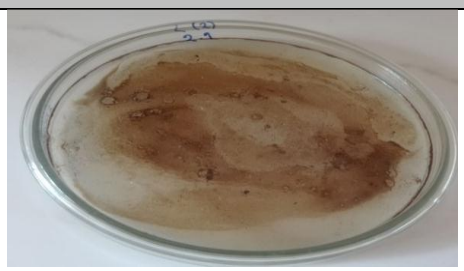
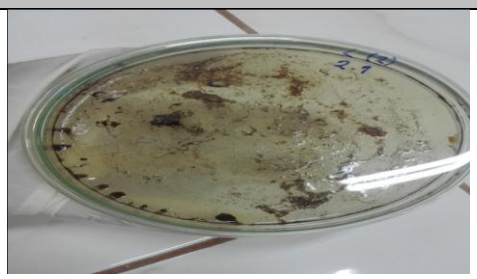
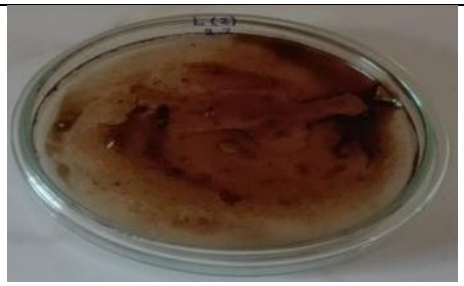
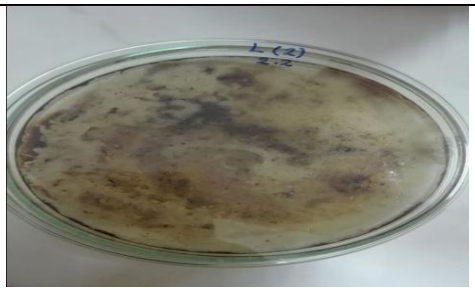
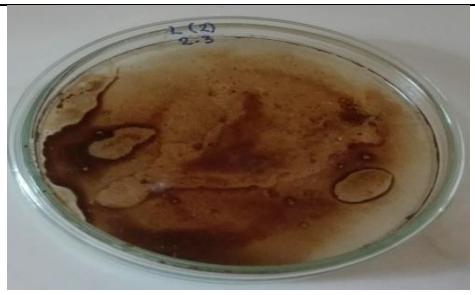
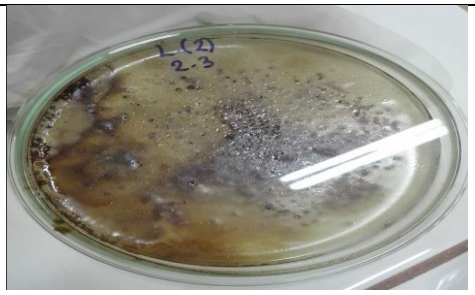
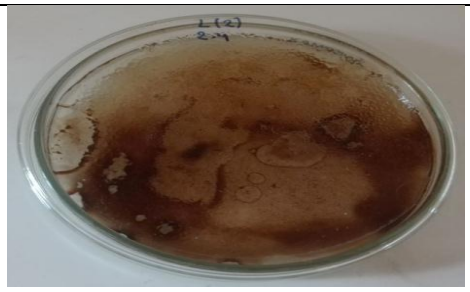
| | |
|---|---|
| L1 1.1 | L1 1.1 |
|  |  |
| L1 1.2 | L1 1.2 |
|  |  |
| L1 1.3 | L1 1.3 |
|  |  |
| L1 1.4 | L1 1.4 |
|  |  |
| L1 1.5 | L1 1.5 |
|  |  |
| L1 1.6 | L1 1.6 |

**Figura 22**. Muestras de entrada de sedimentos

Según la figura 22. Se observa las muestras de entrada de sedimentos de la refinería de Maple, se advierte colonias de bacilos y cocobacilos de forma circular e irregular, asimismo disminución de la turbiedad.

| ANTES | DESPUES |
|---|---|
|  |  |
| L2 2.1 | L2 2.1 |
|  |  |
| L2 2.2 | L2 2.2 |
|  |  |
| L2 2.3 | L2 2.3 |
|  |  |
| L2 2.4 | L2 2.4 |

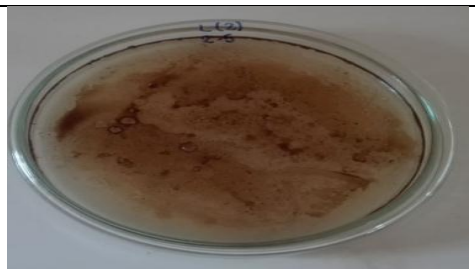
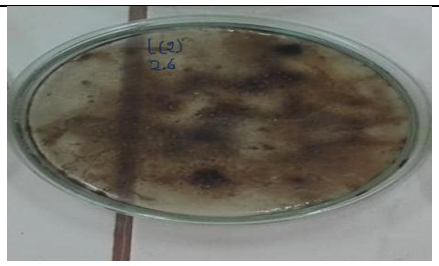
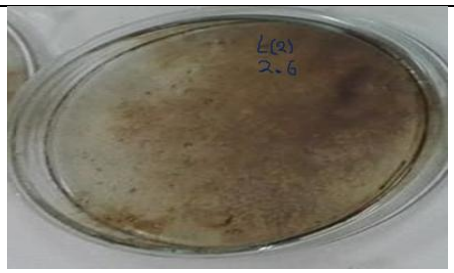
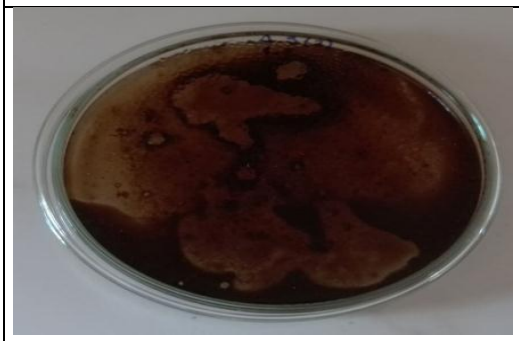
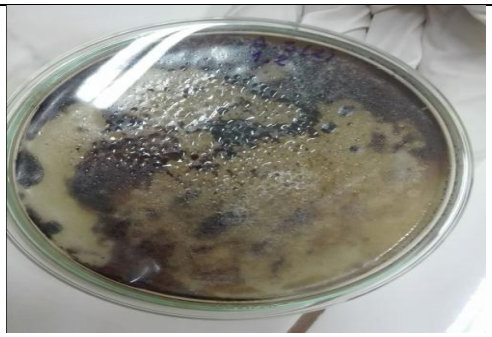
| | |
|---|---|
|  |  |
| L2 2.5 | L2 2.5 |
|  |  |
| L2 2.6 | L2 2.6 |

**Figura 23**. Muestras de salida de sedimentos

La figura 23. Indica los resultados de las muestras de sedimento de salida de la quebrada que discurre por medio de la refinería Maple, presentándose una disminución de la turbiedad y una coloración verdosa, con capas superficiales oscuras.

| ANTES | DESPUES |
|---|---|
|  |  |
| A1 1.1 | A1 1.1 |
|  |  |
| A1 1.2 | A1 1.2 |

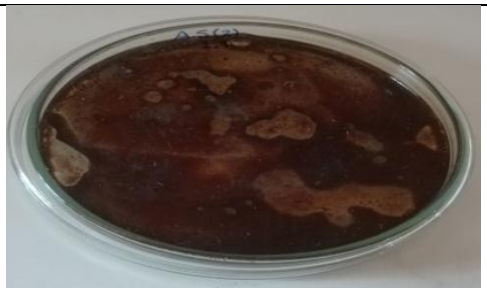
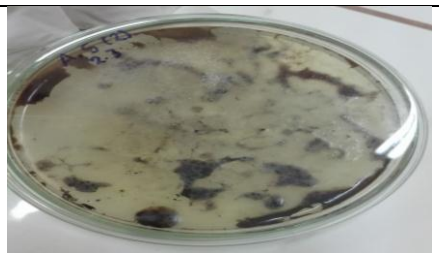
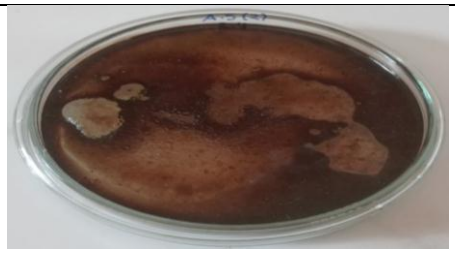
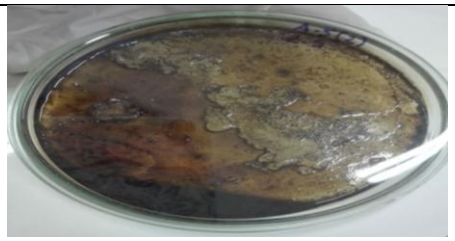
| | |
|---|---|
|  |  |
| A1 1.3 | A1 1.3 |
|  |  |
| A1 1.4 | A1 1.4 |
|  |  |
| A1 1.5 | A1 1.5 |
|  |  |
| A1 1.6 | A1 1.6 |

**Figura 24.** Muestras de entrada de Agua Superficial

Como se observa en la figura 24. Las muestras presentes son de Agua superficial de la entrada de la refinería de Maple, identificándose variaciones en la turbiedad con una mayor presencia de capa lechosa en la muestra final.

| ANTES | DESPUES |
| --- | --- |
|  |  |
| A2 2.1 | A2 2.1 |
|  |  |
| A2 2.2 | A2 2.2 |
|  |  |
| A2 2.3 | A2 2.3 |
|  |  |
| A2 2.4 | A2 2.4 |
|  |  |
| A2 2.5 | A2 2.5 |

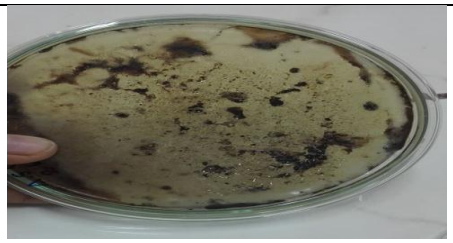
| | |
|---|---|
|  |  |
| A2 2.6 | A2 2.6 |

**Figura 25**. Muestras de salida de Agua Superficial.

En la figura 25. Las muestras presentes son de Agua superficial de la salida de la refinería de Maple, se puede observar un color oscuro, con capa superficial blanquecina, con formas irregulares.

## 4.2. Caracterización de parámetros fisicoquímicos

De los parámetros fisicoquímicos identificados en campo, se obtuvieron los siguientes datos:

**Tabla 6.** Parámetros fisicoquímicos de muestras

| MUESTRAS | Parámetros Fisicoquímicos | | |
|---|---|---|---|
| | pH | Tº | Oxígeno Disuelto |
| A1 | 7.3. | 30.8 | 3.5 |
| L1 | 7.1. | 28.9 | - |
| A2 | 7.3 | 30.9 | 3.8 |
| L2 | 7.1. | 28.4 | - |

Las muestras tomadas fueron consideras de la quebrada “Anis Caño” que atraviesa la refinería de MAPLE GAS CORPORATION DEL PERU S.R.L.

# CAPITULO V

# DISCUSION

## 5.1. Identificación de bacterias

En la identificación bioquímica se evidencio la existencia de bacterias del género *Pseudomonas aeruginosa, Acinobacter sp, Serratia sp, Enterobacter sp y Citrobacter sp* (figura 9)*;* géneros identificadas también por otros investigadores, quienes afirman que los microorganismos del género *Pseudomonas sp*., tienen un rol importante en la degradación de petróleo, así Leahy y Colwell en (1990), indicaron que los microorganismos degradadores de hidrocarburos más importantes, tanto en aguas como en suelos son: *Pseudomonas sp*., *Achromobacter, Acinetobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Flavobacterium* y *Nocardia.*

De esta manera Altamirano & Pozzo (2000) aislaron e identificaron seis especies bacterianas nativas con capacidad hidrocarburolitica de suelos sometidos a biorremediación mediante medios selectivos adicionados con petróleo crudo. De esta misma manera, Cubitto & Cabezali (2002), mediante cultivos semicontinuos adicionados con petróleo crudo lograron aislar bacterias con capacidad de degradar principalmente hidrocarburos de tipo lineal.
Rentería y Miranda, en (1998), encontraron cinco cultivos de mayor actividad biodegradativa: *Micrococcus, Pseudomonas, Alcaligenes, Acinetobacter* y *Flavobacterium* y Tantaleán y Altamirano, en 1998, encontraron un cultivo mixto de *Pseudomonas sp*. nativas que tuvieron la mayor capacidad para utilizar el petróleo diesel D2.

Arenas, en (1999), en Lima, aisló 262 cepas bacterianas, a partir de muestras de suelo y agua de la refinería “La Pampilla”, de las cuales se seleccionaron 55 cepas bacterianas, que fueron las de mayor actividad emulsificante, a las cuales se les evaluó su actividad degradativa. El 100 % crecieron sobre el petróleo y mostraron crecimientos comparables a las escalas dos, tres, cuatro y cinco de Mc. Farland. Los microorganismos aislados fueron *Pseudomonas*

*aeruginosa, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas aureofasciens, Listonella damsela, Bacillus sphaericus, Bacillus brevis, Enterobacter cloacae, Acinetobacter calcoaceticus var. Anitratus, Hafnia alvei, Citrobacter freundii, Citrobacter amalonaticus, Sphingobacterium multivorum, Staphylococcus Sp., Neisseria Sp., Micrococcus sp.*

Según Carrasco (2009), en su investigación denominado "Aislamiento e identificación de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, comprobando su actividad enzimática", logró aislar 5 cepas bacterianas que corresponden, de acuerdo a los resultados obtenidos con el sistema de identificación BIOLOG@ a: Enterobacter sp., Enterobacter aerogenes (Klebsiella mobilis), Cellulosimicrobium cellulans, Enterobacter sp., y 1 identificación no segura de Corynebacterium sp.

Asimismo, según el artículo de la Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias en la investigación "Degradación microbiana de gasolina en suelos agrícolas de Pueblo Nuevo, Guanajuato", la microbiota aislada fue identificada por pruebas bioquímicas y moleculares e incluye cepas de los géneros *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.* y *Bacillus sp*.

### 5.1.1. Bacteria identificada en sedimento por predominancia

En la figura 10. Bacterias identificadas en muestras de sedimento, se verifico la existencia de bacterias del genero *Pseudomonas aeruginosa y Acinobacter sp*, esto puede explicarse por la actividad de biodegradación complementaria de estos dos géneros, puesto que la degradación de los aromáticos por Pseudomonas depende en algunos casos de los metabolitos producidos por la degradación de los alcanos por Acinetobacter (Kamukai-Nakamura & Sugiura, 1996).

*Acinetobacter* es un cocobacilo gram negativo aeróbico (Madigan, Martinko, & Parker, 1999), es considerado como el componente ideal de los consorcios de degradación de los hidrocarburos debido a que descompone un gran número

de alcanos además de producir un bioemulsificante que facilita el acceso a los hidrocarburos para las demás cepas del consorcio (Ron; Rosenberg, 2002).

Su capacidad para consumir los hidrocarburos se ve relacionada con el hecho de que produce un biosurfactante o bioemulsificante (Marin, Pedregosa, & Rios, 1995).

### 5.1.2. Bacterias identificadas en agua superficial por predominancia.

De la figura 11. Bacterias identificadas en muestras de agua superficial, se verifico la existencia de *Pseudomonas aeruginosa, Serratia sp, Enterobacter sp y Citrobacter sp* a excepción de *Acinobacter sp,* según Atlas et al. (1991), la tolerancia microbiana a la presencia de petróleo crudo representada por su adaptación a los medios de cultivos con hidrocarburos, permite la selectividad poblacional, pues solo aquellas cepas bacterianas con la capacidad de utilizar los hidrocarburos para sus procesos metabólicos podrán crecer y multiplicarse en dichos medios (Lopolito, Molina, & Corbella, 1996). Los desiguales rangos de adaptabilidad bacteriana a la presencia de petróleo crudo en el estudio y la capacidad de ciertas bacterias de poseer características degradativas se manifiesta por tanto en el crecimiento o no de colonias en los medios de cultivo.

Finalmente, de las muestras en general se obtuvo un mayor dato de *pseudomonas* esto debido a que las *Pseudomonas spp*., responden a cambios ambientales modificando su composición de ácidos grasos de la membrana celular que le permite mantener la homeoviscosidad ante situaciones de estrés y su posterior adaptabilidad. Además, los cambios de temperatura las *Pseudomonas spp.* presentan un incremento de la insaturación de ácidos grasos con la disminución de esta con el fin de mantener la fluidez de la membrana, y ante el aumento de temperatura hay un incremento de ácidos grasos saturados y una disminución de los ácidos grasos insaturados (Wilkinson,1998), demostrando de esta manera que las *Pseudomonas spp.* son microorganismos euritérmicos, es decir, microorganismos capaces de adaptarse a los cambios.

Este género es uno de los más proclives a la degradación de compuestos orgánicos, especialmente cepas de la especie *Pseudomonas aeruginosa* siendo una opción muy viable el uso de esta cepa para el proceso de biorremediación, ya que son microorganismos que parecen ser el más ubicuo y el más adaptable a los diferentes contaminantes (Gonzales, 2011).

Marín *et al.* (1995) aislaron más de 20 cepas bacterianas a partir de una muestra de suelo contaminado con hidrocarburos; De ellas, 15 degradaban los hidrocarburos puros, en presencia y en ausencia de glucosa; entre ellas *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Acinetobacter*. El hecho de que ya compartan un ambiente sugiere que han creado relaciones simbióticas para sobrevivir en él.

## 5.2. Parámetros Fisicoquímicos

Respecto a los parámetros fisicoquímicos, la temperatura es unos de los factores ambientales más importantes que afecta al crecimiento y a la supervivencia microbiana. Puede afectar a los microorganismos vivos de dos formas muy diferentes. A medida que la temperatura sube, las reacciones enzimáticas son más rápidas y el crecimiento se hace más rápido. Sin embargo, por encima de una cierta temperatura, las proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares pueden dañarse irreversiblemente. Por encima de este punto las funciones celulares paran. Por tanto, para cada microorganismo existe una temperatura mínima por debajo de la cual no existe crecimiento, una temperatura optima a la cual el crecimiento es el más rápido posible y una temperatura máxima rebasada la cual no existe crecimiento (Madigan, Martinko, & Parker, 2000)

En la tabla 6. Los valores de temperatura se encuentran entre los 30 ºC, encontrándose en un grado aceptable para el crecimiento de las bacterias Generalmente, las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 20 y 30 ºC (condiciones mesófilas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40 ºC e inhibiéndose a inferiores a 0 ºC (Maroto, 2012).

El pH de los medios se ajusta a 7 debido a que las bacterias de los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas* son neutrófilas y que su pH óptimo de crecimiento es 7. La mayoría de las bacterias crecen a este pH debido a que es equivalente al pH interno de las células, que se mantiene por medio de un intercambio de iones entre el medio y la célula con el fin de mantener un equilibrio osmótico (Madigan, Martinko, & Parker, 1999), en ese sentido según resultados también se encontraría dentro de recomendable.

El pH del medio es por lo general modificado por los microorganismos contenidos en este. Según las fuentes de energía disponibles y su metabolismo, el medio puede acidificarse o alcalinizarse. El pH puede disminuir si existe un metabolismo que genere ácidos orgánicos como en el caso de la metabolización de los hidrocarburos puede aumentar si se produce amoníaco tras el consumo de aminoácidos (Prescott, Harley, & Klein, 1995).

Dicho esto, la actividad metabólica de los microorganismos puede ser responsable del cambio de pH y este cambio puede utilizarse como indicador de un cambio metabólico en el cultivo.

En el caso del oxígeno disuelto, como elemento constituyente, también es requerimiento para la respiración aeróbica para cubrir sus necesidades energéticas y para ello el oxígeno funciona como agente oxidante terminal, organismos denominados aerobios estrictos (Stanier, 1992).

Según la tabla 6. Los resultados muestran un nivel alto de oxígeno disuelto, esto resulta beneficio para la acción de las bacterias. La mayor parte de hidrocarburos presentes en los productos petrolíferos son degradados con mayor extensión y rapidez de forma aeróbica (O2 como aceptor final de electrones), ya que en ausencia de O2, y en presencia de aceptores de electrones alternativos (NO3 - SO42- CO2 Mn4+ y Fe3+) los hidrocarburos pueden ser degradados, pero con unas tasas de biodegradación muy inferiores a las aeróbicas (Holliger y Zehnder, 1996; Grishchenkov et al., 2000; Boopathy, 2002; Massias et al., 2003).

# CAPITULO VI

# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 6.1. CONCLUSIONES

- Se identificaron cinco (05) géneros bacterianos: i) *Pseudomonas aeruginosa (*58.3%*), ii) Acinobacter sp* (20.8%), *iii) Serratia sp* (8.3%), *iv) Enterobacter sp* (8.3%) *y v) Citrobacter sp* (4.2%); en las muestras tomadas de entrada y salida de una actividad petroquímica, las cuales tuvieron capacidad de adaptación y crecimiento en cultivo con petróleo como fuente de carbono y energía.

- Se obtuvieron datos de los parámetros de temperatura, pH y oxígeno disuelto del área de estudio.

## 6.2. RECOMENDACIONES

- Evitar al máximo la manipulación de las muestras, esto podría perjudicar los resultados.

- Es necesario aumentar el tiempo de incubación, ha mayor tiempo de incubación, mayor presencia de microorganismos.

- Llevar un monitoreo diario de las fases de pre-enrequicimiento y enriquecimiento de las muestras, con el fin de analizar cambios físicos y procesos microbiológicos.

- Seguir con los estándares de trabajo durante un proceso microbiológico, ya que un mal procedimiento podría originar el contagio de enfermedades.

- Es sumamente importante mantener las muestras en agitación constante y en condiciones de temperatura estable a 34.5ºC, este proceso ayuda y agiliza el crecimiento y reproducción de los microoganismos.

- La bioremediacion por medio de las bacterias *Pseudomonas aeruginosas* y *Acinetobacter sp* en ecosistemas alterados por derrames de petróleo sean aplicados en ecosistemas húmedos.

# REFERENCIA BIBLIOGRAFICA


Adams, R., Zavala, J., & Morales, F. (2008). *Concentración residual de hidrocarburos en el suelo del trópico. II: Afectación a la fertilidad y su recuperación.*

Adams, R., Zavala-Cruz, J., & Morales-García, F. (2008). *Concentración residual de hidrocarburos en el suelo del trópico. II: Afectación a la fertilidad y su recuperación.*

Ahn, J. K. (2006). *Analysis of bacterial diversity and community structure in forest soils contaminated with fuel hydrocarbon.*

Alexander, M. (1999). *Factors affecting microbial biodegradation. En: Alexander M, editor. Biodegradation and Bioremediation.* New York: Academic Press.

Altamirano, M., & Pozzo, M. (2000). *Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburolíticas provenientes de un suelo sometido a biorremediación.* Buenos Aires.

American Petroleum Institute, A. (1972). *Detection, sampling, and analysis of hydrocarbons. The migration of petroleum products in soil and ground water.* Whashingtn D.C.

Arenas, S. (1999). *Aislamiento y caracterización de bacterias de ambientes contaminados por petróleo en la refinería "La Pampilla". .* Lima.

Atlas, R. (1981). *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental.*

Atlas, R., & Bartha, R. (1997). *The microbiology of aquatiic oil spills. Adv. Appl. Microbiol.*

Atlas, R., & Bartha, R. (2002). Ecología Microbiana y microbiología ambiental. España: Addison Wesley.

Balba, M., Al-Awadhi, N., & Aldaher, R. (1998). *Bioremediation of oil-contaminated soil : microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation.*

Bastida, F. N. (2010). *Tracing changes in the microbial community of a hydrocarbon-polluted soil by cultura-dependent proteomics.*

Benavides, L., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, A., Gutierrez, S., & Garcia, J. (2006). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo* (Vol. 4). NOVA Publicación científica.

Bisbiroulas, P. P. (2010). *Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen Listeria monocytogenes as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride.* Letters in Applied.

Bracho, M., Diaz, L., & Soto, L. (2004). *Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por Pseudomonas spp.* Ciencia.

Burgos, R. (1999). *Degradación de hidrocarburos.*

Castro, F., Forero, D., Ramirez, J., & Reina, M. (2014). *Evaluación de la contribución económica del sector de hidrocarburos colombiano frente a diversos escenarios de producción. FEDESARROLLO para la Unidad de Planeación Minero Energética –UPME.*

Chaerun, S., Tazaki, K., Asada, R., & Kogure, K. (2004). *Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria.*

Chan, J., Ochoa, S., & Perez, I. (2012). *Germinación y sobrevivencia de especies arbóreas que crecen en suelo contaminados por hidrocarburos.*

Christon, J., Hurst, G., & Knudeen, R. (1997). *Manual of environmental microbiology. American Society for Microbiology. ASM Press.* Washington.

Cubito, M., & Cabezali, C. (2000). Tipificación y evolución de la actividad degradadora de hidrocarburos de una cepa bacteriana aislada del estuario de Bahía Blanca, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 141-148.

Cuneo, I. (2014). Recuperado el 19 de Marzo de 2019, de https://www.perupetro.com.pe/wps/wcm/connect/097c40bb-125b-4ed0-ac1a-dc5e77953eb0/140212_peru+energia+presentacion+final+feb.pdf?mod=ajperes

Das, N., & Chaldran, P. (2011). *Microbial degradation gradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An Overview.*

Das, N., & Chandran, P. (2011). *Microbial de-gradation of petroleum hydrocarbon conta-minants: An Overview. Biotechnol. Reserch. Internal.*

*Diario Correo*. (13 de Enero de 2017). Recuperado el 3 de Febrero de 2019, de https://diariocorreo.pe/peru/embarcacion-produce-derrame-de-petroleo-crudo-en-rio-ucayali-723877/

Diaz, I., E, F., Gallegos, M., & Gutierrez, M. (1999). *Biodegradación de hidrocarburos por un consorcio microbiano de la rizósfera de cyperus laxus lam. Libro de Resúmenes: VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería.* Mexico.

Díaz-Martínez, E. A., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suarez, J., & García-Barradas, O. (2013). *Crecimiento de Casuarina equisetifolia (Casuarinaceae) en suelo con diesel, y aplicación de bioestimulación y bioaumentación.* Biol.

Echeverri, G., Manjarrez, G., & Cabrera, M. (2010). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *NOVA - Publicación Científica EN CIENCIAS BIOMÉDICAS*.

Elblogverde.com. (2016). *La selva amazoniaca en peligro por la explotacion marina*. Obtenido de Elblogverde.com: https://elblogverde.com/la-selva-amaznica-en-peligro-por-la-explotacin-petrolera

Enviroment Protection Agency, E. (1999). *Aerobic biodegradation of organic chemicals in environmental media: A summary of field and laboratory studies.*

Ercoli, E., & Galvez, J. (2001). *Tratamiento biológico ex situ de residuos semisólidos de oleoductos.Laboratorio de Bioprocesos; De Cuyo.* Argentina.

Ercoli, E., Galvez, J., Di Paola, M., C. J., Videla, S., Medaura, M., & Bauzá, J. (2000). *Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo.* Argentina.

Escalante, R. (2002). *Biodegradación de Crudo de Petróleo en Terrarios. Tesis para optar al grado de Magíster. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.* Lima, Peru .

Fontúrbel, F., & Acha, D. (2000). *Empleo del método de determinación de biomasa microbiana por fumigación-extracción para el estudio en suelos del altiplano boliviano contaminados por hidrocarburos.*

Fristche, W., & Hofrichter, M. (2004). *Environmental Biotechnology* (1era ed.). London.

Garcia, U., & Aguirre, L. (2014). *Biodegradacion de petroleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de Mexico.*

González, N., Simarro, R., Molina, M., Bautista, L. F., Delgado, L., & Villa, J. (2011). *Effect of surfactants on PAH biodegradation by a bacterial*

*consortium and on the dynamics of the bacterial community during the process.* Bioresource Technology.

Gurdian, M., & Johanning, T. (2002). *Biodegradacion de desechos del refinamiento del petroleo a base de microorganismos eficientes.*

Haristah, & Kaushik. (2009). Biodegradation aspets of Polycyclic Aromatic Hydrocarbos (PAHs):. *Journal of Hazardous Matererials*, 1-15.

Jimènez, L. (2006). *Estudio de impacto ambiental generado por un derrame de hidrocarburos sobre una zona estuarina, aledaña al terminal de ecopetrol en Tumaco.* Bogota, Colombia.

Kamukai-Nakamura, & Sugiura. (1996). *Construction of bacterial consortes that degrade arabian light crude oil. Journal of fermentation and bioengineering.*

kostka, E., & Prakash, O. (2011). *Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacteria community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by Deepwater Horizon oil spill.* Applied and Environmental Microbiology.

Lagrega, M., Buckinghan, L., & Evans, J. (1996). *Gestión de Residuos Tóxico,s Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos* (Vol. II). Madrid, España: McGraw-Hill.

Leahy, J., & Colwell, R. (1990). *Microbial degradation of hydrocarbons in the environment.* Microbiological Reviews.

Levin, M., & Gealt, M. (1997). *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos.* Madrid, España: McGraw-Hill.

Lopolito, M., Molina, M., & Corbella, M. (1996). *Biodegradación de hidrocarburos de petróleo y compuestos relacionados. Instituto Nacional de Ciencia y Técnología Hídrica.*

Mackey, A., & Hoddgkinson, M. (1996). *Assesment of the impact of Naphthalenecontamination on mangrove Assement of the impact of Naphtalene contamination on mangrove fauna using behavioral bioassays.* Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.

Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (1999). *Biología de los Microorganismos.* España, Madrid: Prentice Hall Iberia.

Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2000). *Biología de los microorganismos.* España.

Maposita, M., Fiallos, C., & Calle, W. (2010). *Caracterizaciónmicrobiológica en suelos contaminados por hidrocarburos,de tipo Pseudomonas en el sector Rio Bonanza, provincia de Pastaza.* Guayaquil.

Marin, M., Pedregosa, A., & Rios, S. (1995). *Biodegradation of diesel and heating oil by Acinetobacter calcoaceticus MM5 : its possible applications on bioremediation.* International Biodeterioration and Biodegradation.

Maroto. (2012). *Biorremediacion- El metabolismo degradativo de los microorganismos.*

Màrquez, F., Hernàndez, V., & Lamela, T. (2001). *Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium.*

Martinez, A., & Gaju, N. (2005). El papel de los tapetes microbianos en la biorecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. *Revista Ecosistemas*.

Mashreghi, M., & Marialigeti, K. (2005). *Characterization of bacteria degrading petroleum derivates isolated from contaminated soil and water.* Journal of Sciences.

Mashreghi, M., & Marialigeti, K. (2005). Characterization of bacteria degrading petroleum derivates isolated from contaminated soil and water. Journal.

Matsumiya, Y., Wakita, D., Kimura, A., Sanpa, S., & Kubo, M. (2007). *Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid lipidcontaining.* J Biosci Bioeng.

McGenety, T. B. (2012). *Marine crude-oil biodegradation:a central role for interspecies interactions.* Aquatic Biosystems.

Mendelssohn, A., Andersen, L., Baltz, D., & Carman, R. (2012). *Oil Impacts on Coastal Wetlands: Implications for the Mississippi River Delta Ecosystem after the Deepwater Horizon Oil Spill.*

Mendelssohn, I. A., Andersen, G., Baltz, D., Caffey, R., Carman, K., Fleeger, J., . . . Rozas, L. (2012). *Oil Impacts on Coastal Wetlands: Implications for the Mississippi River Delta Ecosystem after the Deepwater Horizon Oil Spill.*

Morris, A. (1997). *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos.* Madrid, España: Mc Graw Hil.

Morris, B., Henneberger, R., Huber, H., & Moissl-Eichinger, C. (2013). *Microbial syn-trophy: interactions for the common good.* fems Microbiology Reviews.

Mortazavi, B., Horel, A., Beazley, M., & Sobecky, P. (2013). *. Intrinsic rates of pretoleum hydrocarbon biodegradation in Gulf of Mexico intertidal sandy and its enhancement by organic substrates.* Journal of Hazardous Materials.

Ñustez, D. (2012). *Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible. Tesis para obtar el grado de Magister en Ecotecnología. Universidad Tecnologica de Pereira.* Pererira, Colombia.

Pardo, J., Perdomo, M., & Benavides, J. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petroleo," Ingeniería ambiental y sanitaria , Universidad de La Salle, Bogotá D.

*Periodismo Ciudadano*. (3 de Marzo de 2009). Recuperado el 6 de febrero de 2019, de https://gua30.wordpress.com/2009/03/03/derrame-de-petroleo-en-rio-ucayali/

Plus, M. (s.f.). Impacto ambiental, social y tecnológico de los hidrocarburos (en venezuela y el mundo). Obtenido de https://www.monografias.com/docs/Impacto-ambiental-social-y-tecnol%C3%B3gico-de-los-PKMYTSVPJ8G2Y

Prescott, M., Harley, J., & Klein, D. (1995). *Microbiologie.* Bruselas.

Prince, R., Varadaja, J., & Fiocco, R. (1999). *Bioremediation as an oil spill response tool. Environmental Technology.*

*Radio Programas Perù*. (11 de Julio de 2016). Recuperado el 25 de Enero de 2019, de https://rpp.pe/peru/actualidad/cuantos-derrames-de-petroleo-hubo-en-los-ultimos-anos-en-el-peru-noticia-978288

Ràul, G., M Martì, M. P., Carlos, G., & Antoni, R. (2017). *Water contamination from oil extraction activities in Northern Peruvian Amazonian rivers"* (Vol. 225). Environmental Pollution.

Renteria, A., & Miranda, H. (1998). *Aislamiento y selección primaria de microorganismos capaces de utilizar petróleo como única fuente de carbono. Libro de Resúmenes I Congreso Peruano de Biotecnología y Bioingeniería, 12-15 Noviembre.* Trujillo.

Rittman, B. (1994). *In situ bioremediation.* New Jersey.

Rittman, B. (2001). *Biotecnología del medio ambiente, Principios y aplicaciones.* España: McGraw-Hill;.

Rodriguez, P. (2018). *Efecto del humus de lombriz en la remediación de suelos contaminado con crudo de petróleo. Ucayali, Perú.* Pucallpa.

Ros, M., Rodriguez, I., Garcia, C., & Hernandez, T. (2010). *Microbial communities envolved in the bioremediation o fan aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments.*

Saleh, E., Drobiova, H., & Obuekwe, C. (2009). *Predominant culturable crude oil-degrading bacteria in the coast of Kuwait.* International Biodeter Biodegr.

Salleh, A., Ghazali, F., & Rahman, R. (2003). *Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution.* Indian Journal of Biotechnology.

Sarubbi, A. (2000). *Aspectos importantes en biorremediacion.* Argentina: AIDIS.

Shanidul, I., & Tanaka, M. (2004). *Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries approach for management: a review and synthesis.* Mar. Pollut. Bull.

Sharpley, M. (1966). *Petroleum Microbiology. Gulf publishing company.*

Sims, G., E, S., & Konopka, A. (1986). *Degradation of Pyridine by Micrococcus luteus Isolated from Soi.*

*Somos Sur*. (2005). Obtenido de https://www.somossur.net/index.php/economia/bolivia-forestal-balances-y-proyecciones/686-causas-de-la-deforestacion

Spier, C. (2013). *Distribution of hidrocarbons released during the 2010 MC252 oil spill in deep offshore waters.* Envrironmental pollution.

Valderrama, B., & Téllez-Sosa. (2000). *Microbiología del petróleo y sus derivados. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.* Mexico.

Valderrama, G. (2005). Recuperado el 15 de marzo de 2019, de http://www.perutoptours.com.

Velasquez, J. (2017). *Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación.*

Yaya, L. (2017). *Biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo por bacterias nativas sometidas a distintas condiciones de cultivo aplicados en aguas residuales callao – 2017. Facultad de Ingenieria Ambiental. Universidad Cesar Vallejo.* Lima.

Zhengzhi, Z., H, Z., Chunyu, Y., Cuiqing, M., Fei, T., & Ping, X. (2011). *Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons inpetroleum by a newly isolated Pseudomonas aeruginosa.*

Zobell, E. (1946). Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriology Reviews*, 1-49.

# ANEXOS

**Tabla 7.** Componentes del caldo pre-enriquecimiento

| Para 500 ml de solución | | |
|---|---|---|
| **1** | $(NH_4)H_2PO_4$ | 0.45 g |
| **2** | ACPM 1% | 5 ml |
| **3** | Agua destilada | 495 ml |

**Tabla 8.** Componentes de enriquecimiento

| Para 1000 ml de solución | | |
|---|---|---|
| **1** | $K_2PO_4$ | 1.5g/L |
| **2** | $KH_2PO_4$ | 0.5g/L |
| **3** | $(NH_4)_2SO_4$ | 0.5g/L |
| **4** | NaCl | 0.5g/L |
| **5** | $MgSO_4$ | 3.0g/L |
| **6** | $FeSO_4$ | 0.002g/L |
| **7** | $CaCl_2$ | 0.002g/L |
| **8** | ACPM 1% | 10 ml |
| **9** | Agua destilada | 988.75 ml |

**Tabla 9.** Componentes del medio mineralizado

| Para una solución de 500 ml de solución | | |
|---|---|---|
| **1** | Agar-agar | 7.5g/L |
| **2** | APCM 1% | 5 ml |
| **3** | Agua destilada | 495ml |

**Tabla 10.** Componentes para el repique con agar

| Para una solución de 500ml de solución | | |
|---|---|---|
| **1** | Agar nutritivo | 7.5g/L |
| **2** | APCM 1% | 5ml |
| **3** | Agua destilada | 495ml |

**Tabla 11.** Análisis de las muestras de sedimento y agua superficial

Natura Analítica

Natura Analítica SAC
RUC: 20600103661

SECCIÓN II:
ANALISIS DE AGUAS Y ALIMENTOS

**CERTIFICADO DE ANÁLISIS N° 20190358**

| | |
|---|---|
| SOLICITANTE | RUTH LLANCO PALOMINO |
| R.U.C./ D.N.I. | 07765647 |
| MUESTRA | **Caldo de cultivo** |
| CANTIDAD RECIBIDA | 24 unidades |
| ANALISTA RESPONSABLE | Blgo. Miguel Fabian Francisco. |
| *COLECTOR | El Solicitante |
| ANALISIS SOLICITADOS | **MICROBIOLÒGICO** |
| FECHA INICIO DE ENSAYO | 19/03/2019 |
| FECHA TERMINO DE ENSAYO | 30/03/2019 |
| FECHA EMISION DE RESULTADOS | 30/03/2019 |

| RESULTADOS CODIGO | COLONIAS | BIOQUIMICA | GENERO BACTERIANO |
|---|---|---|---|
| Muestra 1 | COLONIAS CON PIGMENTO AZUL VERDOSO EN AGAR CETRIMIDE TAMAÑO: 3 mm – 4 mm Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas Lactosa: Negativo. LIA: N/N, no es una enterobacteria Citrato: Positivo | *Pseudomonas aeruginosa* |
| Muestra 2 | COLONIAS CON PIGMENTO AZUL VERDOSO EN AGAR CETRIMIDE TAMAÑO: 3 mm – 4 mm Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas Lactosa: Negativo. LIA: N/N, no es una enterobacteria Citrato: Positivo | *Pseudomonas aeruginosa* |
| Muestra 3 | COLONIAS CON PIGMENTO AZUL VERDOSO EN AGAR CETRIMIDE TAMAÑO: 3 mm – 4 mm Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas Lactosa: Negativo. LIA: N/N, no es una enterobacteria Citrato: Positivo | *Pseudomonas aeruginosa* |
| Muestra 4 | COLONIAS CON PIGMENTO ROJO PARDUZCO EN AGAR CETRIMIDE TAMAÑO: 3 mm – 4 mm Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas Lactosa: Negativo. LIA: N/N, no es una enterobacteria Citrato: Positivo | *Pseudomonas aeruginosa* |
| Muestra 5 | COLONIAS CON PIGMENTO AMARILLO VERDOSO EN AGAR CETRIMIDE TAMAÑO: 3 mm – 4 mm Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas Lactosa: Negativo. LIA: N/N, no es una enterobacteria Citrato: Positivo | *Pseudomonas aeruginosa* |
| Muestra 6 | COLONIAS CON PIGMENTO AMARILLO VERDOSO EN AGAR CETRIMIDE TAMAÑO: 3 mm – 4 mm Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas Lactosa: Negativo. LIA: N/N, no es una enterobacteria Citrato: Positivo | *Pseudomonas aeruginosa* |
| Muestra 7 | COLONIAS CON PIGMENTO ROJO PARDUZCO EN AGAR CETRIMIDE TAMAÑO: 3 mm – 4 mm Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas Lactosa: Negativo. LIA: N/N, no es una enterobacteria Citrato: Positivo | *Pseudomonas aeruginosa* |
| Muestra 8 | COLONIAS CON PIGMENTO ROJO PARDUZCO EN AGAR CETRIMIDE TAMAÑO: 3 mm – 4 mm Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas Lactosa: Negativo. LIA: N/N, no es una enterobacteria Citrato: Positivo | *Pseudomonas aeruginosa* |
| Muestra 9 | COLONIAS DE COLOR BLANCO CREMA TAMAÑO: 3 mm – 4 mm Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/A sin gas Lactosa: Negativo. LIA: K/K, Citrato: Positivo | *Serratia sp.* |
| Muestra 10 | COLONIAS DE COLOR BLANCO CREMA TAMAÑO: 2 mm – 3 mm Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/A sin gas Lactosa: Negativo. LIA: K/K, Citrato: Positivo | *Serratia sp.* |
| Muestra 11 | COLONIAS CON PIGMENTO ROJO PARDUZCO EN AGAR CETRIMIDE TAMAÑO: 3 mm – 4 mm Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas Lactosa: Negativo. LIA: N/N, no es una enterobacteria Citrato: Positivo | *Pseudomonas aeruginosa* |
| Muestra 12 | COLONIAS CON PIGMENTO AMARILLO VERDOSO EN AGAR CETRIMIDE TAMAÑO: 3 mm – 4 mm Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas Lactosa: Negativo. LIA: N/N, no es una enterobacteria Citrato: Positivo | *Pseudomonas aeruginosa* |
| Muestra 13 | COLONIAS CON PIGMENTO AMARILLO VERDOSO EN AGAR CETRIMIDE TAMAÑO: 3 mm – 4 mm Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas Lactosa: Negativo. LIA: N/N, no es una enterobacteria Citrato: Positivo | *Pseudomonas aeruginosa* |

av. Sáenz Peña 503 PUCALLPA teléfono: 576060 E-MAIL: naturaanalitica@gmail.com

| | | | |
|---|---|---|---|
| Muestra 14 | COLONIAS CON PIGMENTO AZUL VERDOSO<br>EN AGAR CETRIMIDE<br>TAMAÑO: 3 mm – 4 mm<br>Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas<br>Lactosa: Negativo.<br>LIA: N/N, no es una enterobacteria<br>Citrato: Positivo | *Pseudomonas aeruginosa* |
| Muestra 15 | COLONIAS CON PIGMENTO ROJO PARDUZCO<br>EN AGAR CETRIMIDE<br>TAMAÑO: 3 mm – 4 mm<br>Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas<br>Lactosa: Negativo.<br>LIA: N/N, no es una enterobacteria<br>Citrato: Positivo | *Pseudomonas aeruginosa* |
| Muestra 16 | COLONIAS LACTOSA POSITIVO<br>EN AGAR MC CONKEY<br>TAMAÑO: 2 mm – 3 mm<br>Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: A/A con gas<br>Lactosa: Positivo.<br>LIA: K/K descarboxilasa (+)<br>Citrato: Positivo | *Enterobacter sp* |
| Muestra 17 | COLONIAS LACTOSA POSITIVO<br>EN AGAR MC CONKEY<br>TAMAÑO: 2 mm – 3 mm<br>cocobacilos curvos Gram Negativos | TSI: A/A con gas. $H_2S$ (+)<br>Lactosa: Positivo<br>LIA: K/K descarboxilasa (+)<br>Citrato: Positivo | *Citrobacter sp* |
| Muestra 18 | COLONIAS LACTOSA POSITIVO<br>EN AGAR MC CONKEY<br>TAMAÑO: 2 mm – 3 mm<br>Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: A/A sin gas<br>Lactosa: Positivo<br>LIA: K/K descarboxilasa (+)<br>Citrato: Positivo | *Enterobacter sp* |
| Muestra 19 | COLONIAS TRANSLUCIDAS<br>EN AGAR CETRIMIDE<br>TAMAÑO: 2 mm – 3 mm<br>cocobacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas<br>Lactosa: Negativo.<br>LIA: N/N, no es una enterobacteria<br>Citrato: Positivo | *Acinetobacter sp* |
| Muestra 20 | COLONIAS TRANSLUCIDAS<br>EN AGAR CETRIMIDE<br>TAMAÑO: 2 mm – 3 mm<br>cocobacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas<br>Lactosa: Negativo.<br>LIA: N/N, no es una enterobacteria<br>Citrato: Positivo | *Acinetobacter sp* |
| Muestra 21 | COLONIAS TRANSLUCIDAS<br>EN AGAR CETRIMIDE<br>TAMAÑO: 2 mm – 3 mm<br>cocobacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas<br>Lactosa: Negativo.<br>LIA: N/N, no es una enterobacteria<br>Citrato: Positivo | *Acinetobacter sp* |
| Muestra 22 | COLONIAS TRANSLUCIDAS<br>EN AGAR CETRIMIDE<br>TAMAÑO: 2 mm – 3 mm<br>cocobacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas<br>Lactosa: Negativo.<br>LIA: N/N, no es una enterobacteria<br>Citrato: Positivo | *Acinetobacter sp* |
| Muestra 23 | COLONIAS TRANSLUCIDAS<br>EN AGAR CETRIMIDE<br>TAMAÑO: 2 mm – 3 mm<br>cocobacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas<br>Lactosa: Negativo.<br>LIA: N/N, no es una enterobacteria<br>Citrato: Positivo | *Acinetobacter sp* |
| Muestra 24 | COLONIAS CON PIGMENTO AMARILLO VERDOSO EN AGAR CETRIMIDE<br>TAMAÑO: 3 mm – 4 mm<br>Bacilos curvos Gram Negativos | TSI: K/K sin gas<br>Lactosa: Negativo.<br>LIA: N/N, no es una enterobacteria<br>Citrato: Positivo | *Pseudomonas aeruginosa* |

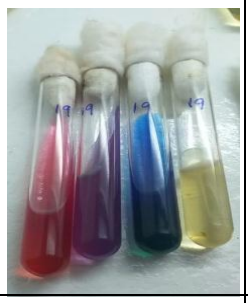
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
|  |  |  |  |  |
| MUESTRA 1 | MUESTRA 2 | MUESTRA 3 | MUESTRA 4 | MUESTRA 5 |
|  |  |  |  |  |
| MUESTRA 6 | MUESTRA 7 | MUESTRA 8 | MUESTRA 9 | MUESTRA 10 |
|  |  |  |  |  |
| MUESTRA 11 | MUESTRA 12 | MUESTRA 13 | MUESTRA 14 | MUESTRA 15 |
|  |  |  |  |  |
| MUESTRA 16 | MUESTRA 17 | MUESTRA 18 | MUESTRA 19 | MUESTRA 20 |
|  |  |  |  | |
| MUESTRA 21 | MUESTRA 22 | MUESTRA 23 | MUESTRA 24 | |

**Figura 26.** Test químicos aplicados a medios biológicos



**Figura 27.** Muestra de entrada de la quebrada que discurre por medio de la refinería Maple



**Figura 28.** Muestra de salida de la quebrada que discurre por medio de la refinería Maple

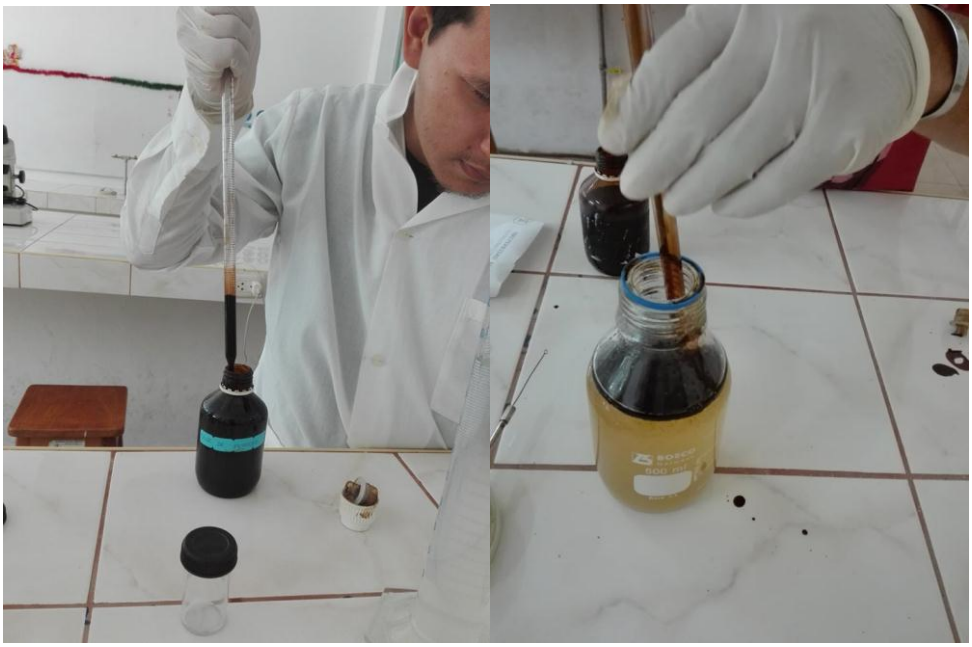


**Figura 29.** Preparación del caldo de pre-enriquecimiento




**Figura 30**. Preparación del caldo de enriquecimiento



**Figura 31**. Inoculación de muestras



**Figura 32**. Equipos de campo



**Figura 33:** Inoculación en placa petri.



**Figura 34:** Proceso de degradación del crudo de petróleo