

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

**“Biodegradación de tolueno por *Pseudomonas Aeruginosa* en suelos contaminados con derrames de petróleo. Iquitos”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORES:**

- Bach. Dominguez Vega, Saul Yovani
- Bach. Rosales Lecca, Sharon Fiorela

**ASESOR:**

M. Sc. Alva Muñoz, Eterio Amaranto  
ORCID: 0000-0002-4113-7981

**Nuevo Chimbote - Perú**

**2023**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

**“BIODEGRADACIÓN DE TOLUENO POR *Pseudomonas aeruginosa*  
EN SUELOS CONTAMINADOS CON DERRAMES DE PETRÓLEO.  
IQUITOS”**

**Tesis para obtener el Título Profesional de Licenciado en Biotecnología**

**Revisado y aprobado por el Asesor:**



**M. Sc. Alva Muñoz, Eterio Amaranto**  
**DNI: 32406295**  
**ID ORCID: 0000-0002-4113-7981**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

**Revisado y aprobado por el Jurado Evaluador:**

---

**Ms. Jose Villanueva Carlos**  
**PRESIDENTE**

**DNI: 32733772**  
**ID ORCID: 0000-0002-5056-0001**

---

**M. Sc. Eterio Amaranto Alva Muñoz**  
**SECRETARIO**

**DNI: 32406295**  
**ID ORCID: 0000-0002-4113-7981**

---

**M. Sc. Victor Eduardo Lecca Zavaleta**  
**INTEGRANTE**

**DNI: 42636735**  
**ID ORCID: 0000-0002-3759-8128**

## ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en la reunión en el laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias de la UNS, dando cumplimiento a la Resolución N° 003-2023-UNS-CFC , siendo las 18:00 horas del día 20 febrero del 2023

se reunió el Jurado Evaluador presidido por el Ms. Blgo Mblgo José Villanueva Carlos, teniendo como miembros a. M.Sc. Eterio Alva Muñoz. (secretario) (a) y al M. Sc. Víctor Lecca Zavaleta (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA, realizado por Bachilleres: Domínguez Vega, Saúl Yovani y Rosales Lecca, Sharon Fiorela de la Escuela Profesional de Biotecnología. quienes sustentaron la tesis intitulada:

**“BIODEGRADACIÓN DE TOLUENO POR *Pseudomonas aeruginosa* EN SUELOS CONTAMINADOS CON DERRAMES DE PETRÓLEO. IQUITOS”**

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **MUY BUENO** asignándole un calificativo de Diecisiete puntos. Según artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU-R-UNS)

Siendo las 19:00 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad



Nombre: Ms. José Villanueva Carlos  
Presidente



Nombre: M Sc Eterio Alva Muñoz  
Secretario



Nombre: M Sc Víctor Lecca Zavaleta  
Integrante

**Distribución: Integrantes JE (03), tesis ( ) y archivo FC (02).**

## **DEDICATORIA**

*A nuestros padres, por el apoyo incondicional al estar  
en cada etapa de nuestro desarrollo profesional, a los  
cuales estaremos eternamente agradecidos y a nuestros  
familiares por el inmenso amor que nos brindaron  
siempre .*

## AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios Padre por ser nuestro amparo y fortaleza, presente en nuestros aciertos, reveses, alegrías y preocupaciones que caracterizaron el transitar de este camino que hoy vemos realizado, que sin su bendición no hubiese sido posible.

Agradezco sinceramente y plenamente a mi familia a mi padre, madre, hermanos por su incomparable apoyo para cumplir con los objetivos propuestos

Muestro mi inmensa gratitud a todo el conjunto de profesores que contribuyeron eficazmente en mi educación, que, con su excelente nivel académico-humanístico, trazan el camino a seguir de futuros profesionales de calidad; asimismo, hago extensivo mi agradecimiento a todas aquellas personas que supieron apoyarme en toda circunstancia vivida durante mi formación profesional, a quienes sé que comparten conmigo la satisfacción de culminar el presente trabajo.

Al MSc. Otilia Acha de la Cruz JEFE DE LABICER, por el apoyo en el análisis químico de las muestras de suelo contaminado por petróleo crudo y brindarnos el apoyo académico que necesitábamos en el desarrollo de nuestro trabajo de investigación.

Al Ing. Anthony Jeams Fuentes Olivera jefe del LABORATORIO DE INVESTIGACION DE TECNOLOGIAS LIMPIAS Y/O EMERGENTES, por el apoyo en el análisis químico de las muestras líquidas después del tratamiento y brindarnos el apoyo académico que necesitábamos en el desarrollo de nuestro trabajo de investigación.

A nuestro asesor el M Sc. Blgo. Mblgo. Eterio Alva Muñoz por su empeño e interés en la realización de nuestro trabajo de investigación.

Al Técnico del laboratorio de Investigación de la Universidad Nacional de Santa, André Ángeles Angulo por el apoyo en la ejecución de nuestro trabajo de investigación.

Y a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo de investigación.

## INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
INDICE DE CONTENIDOS.....	XII
INDICE DE TABLAS .....	XV
INDICE DE GRAFICO.....	XVI
INDICE DE FIGURAS .....	XVIII
ABREVIATURAS .....	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT .....	XIV
I. INTRODUCCION .....	15
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo general.....	16
1.1.2 Objetivos Específicos .....	16
1.2 HIPOTESIS.....	17
1.3 JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACIÓN .....	17
II. MARCO TEORICO.....	18
2.1 Antecedentes A nivel internacional.....	18
2.1.2 Antecedentes A nivel nacional.....	18
2.2 MARCO CONCEPTUAL .....	22
2.2.1 Consecuencias Sobre El Ambiente .....	23
2.2.2 Petróleo Crudo Loreto .....	23
2.2.3 Derrames Por La Actividad Petrolera .....	23

2.3. LA BIODEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS .....	25
2.3.1. Biodegradación De Compuestos Aromáticos .....	26
2.3.2 Las Bacterias Degradadoras De Hidrocarburos .....	29
2.3.3. <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> .....	30
2.4. FACTORES QUE DETERMINAN EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN	30
2.4.1. Oxígeno (O <sub>2</sub> ). .....	30
2.4.2. Humedad (H) .....	31
2.4.3. Temperatura (T°) .....	31
2.4.4. Nutrientes .....	31
2.4.5. Textura del suelo .....	31
2.5. TASA DE BIODEGRADACION .....	32
2.6. TOLUENO .....	33
2.6.1. Efectos Sobre La Salud.....	34
2.7. COMPORTAMIENTO EN EL MEDIO AMBIENTE DEL TOLUENO.....	36
2.7.1. Agua: .....	36
2.7.2. Aire:.....	37
2.7.3. Suelo:.....	37
2.7.4 Degradación, productos de la descomposición y tiempo de vida media: .....	37
2.8 Propuesta experimental .....	37
III. MATERIALES Y METODOS .....	38
3.1 Recolección del suelo contaminado. ....	38
3.1.1 Preparación del suelo contaminado para la extracción de hidrocarburos. ....	39

3.2	Aislamiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
3.2.1	Preparación del medio Agar Cetrimide .....	39
3.2.2	Aislamiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	40
3.2.3	Cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en Agar Cetrimide.....	40
3.3	Selección de cepas bacterianas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	40
3.3.1	preparación del medio de mantenimiento -medio agar glutamato. ....	41
3.3.2	Siembra de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en Agar Glutamato.....	41
3.4	Establecimiento de la concentración inicial del inóculo .....	41
3.5	Preparación del caldo de soja tripticasa. ....	42
3.5.1	Tratamiento en Matraces de 500ml.....	42
3.7	Cinética Microbiana.....	44
3.6	ANALISIS ESTADISTICO .....	44
IV.	RESULTADO Y DISCUSION.....	44
4.1	DISCUSIÓN.....	61
V.	CONCLUSIONES.....	67
5.1.	RECOMENDACIONES.....	68
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y VIRTUALES .....	69
VII.	ANEXOS .....	72

## INDICE DE TABLAS

Tabla1: Organismos que intervienen en el proceso de degradación (Olivier: Margot 2005). .....	29
Tabla2: Datos Físicos y químicos del Tolueno .....	34
Tabla 3: Tratamientos aplicados para la biodegradación de tolueno.....	43
Tabla 4: N° de días para la toma de muestra por cada replica y tratamiento 1,2 y 3 de las diferentes concentraciones. ....	43
Tabla 5: Resultados de la muestra de la primer replica.....	44
Tabla N°6. Peso en gramos de biomasa del diseño patrón vs sustrato .....	45
Tabla N°7. Matraz 1 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^4$ vs sustrato .....	45
Tabla N°8. Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^4$ vs sustrato .....	47
Tabla N°9. Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^4$ vs sustrato .....	47
Tabla N°9. Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^6$ vs sustrato .....	48
Tabla N°11. Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^6$ vs sustrato .....	49
Tabla N°12. Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^6$ vs sustrato .....	50
Tabla N°13. Matraz 1 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^8$ vs sustrato .....	50
Tabla N°14. Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^8$ vs sustrato .....	51
Tabla N°15. Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^8$ vs sustrato .....	52
Tabla N°17. Peso en gramos de biomasa del diseño patrón vs sustrato .....	53
Tabla N°18. Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^4$ vs sustrato .....	53

Tabla N°19. Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^4$ vs sustrato .....	54
Tabla N°20. Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^4$ vs sustrato .....	55
Tabla N° 21. Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^6$ vs sustrato .....	56
Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT. ....	56
Tabla N°22. Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^6$ vs sustrato .....	56
Tabla N°23. Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^6$ vs sustrato .....	57
Tabla N°24. Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^8$ vs sustrato .....	58
Tabla N°25. Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^8$ vs sustrato .....	59
Tabla N°26. Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^8$ vs sustrato .....	59
Tabla N° 16. Replica 3 Peso en gramos de biomasa del diseño patrón vs sustrato .....	80
Tabla N°27: Biodegradación de Tolueno en los tratamientos 1,2 y 3.....	80

## INDICE DE GRAFICO

Grafica 1. Peso en gramos de biomasa del diseño patrón vs sustrato.....	45
Grafica 2. Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^4$ vs sustrato.....	46
Grafica 3. Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^4$ vs sustrato .....	47
Grafica 4. Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^4$ vs sustrato	48
Grafica 5. Matraz 1 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^6$ vs sustrato	49
Grafica 6. Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^6$ vs sustrato	49
Grafica 7. Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^6$ vs sustrato	50
Grafica 8. Matraz 1 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^8$ vs sustrato	51
Grafica 9. Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^8$ vs sustrato	52
Grafica 10. Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^8$ vs sustrato .....	52
Grafica 11. Replica 3 Peso en gramos de biomasa del diseño patrón vs sustrato.....	53

Grafica 12. R3 Matraz 1 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^8$ vs sustrato.....	54
Grafica 13. R3 Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^4$ vs sustrato.....	55
Grafica 14. R3 Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^4$ vs sustrato.....	55
Grafica 15. R3 Matraz 1 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^6$ vs sustrato.....	56
Grafica 16. R3 Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^6$ vs sustrato.....	57
Grafica 17. R3 Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^6$ vs sustrato.....	58
Grafica 18. R3 Matraz 1 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^8$ vs sustrato.....	58
Grafica 19. R3 Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^8$ vs sustrato.....	59
Grafica 20. R3 Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración $30 \cdot 10^8$ vs sustrato.....	60
Grafica 21. El aumento de la biomasa de las diferentes concentraciones de <i>P. aeuriginosa</i> durante los 28 días.....	60
Grafica 22. La disminución de Tolueno durante los 28 dias .....	61

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Reacción de degradación del benceno, del tolueno y del xileno .....	27
Figura 2: Rutas aeróbicas de degradación de tolueno.....	28
Figura 3: Composición del suelo. ....	32
Figura 4: Proceso de degradación de hidrocarburo.....	33
Figura 5: Ruta Metabólica del Tolueno .....	38
Figura 6:Ubicación de la refinería Petro Perú.....	38
Figura 7:Refineria Petro Perú-Iquitos .....	72
Figura 8: Muestra del suelo contaminado extraído de la refinería de Petro Perú-.....	72
Figura 9: Proceso de aislamiento de pseudomonas aeruginosa .....	72
Figura 10: Plaqueado del medio agar cetrimide. ....	73
Figura 11: Cultivo de pseudomonas aeruginosa. ....	73
Figura 12: Plaqueado y siembra de <i>P. aeruginosa</i> . ....	74
Figura 13: Tinción gram de pseudomonas aeruginosa. ....	74
Figura 14: Comparamos el tubo N°6 (18 x 10 <sup>8</sup> ) .....	74
Figura 15: Dilución (1/5) 5ml de inculo y 1ml de agua.....	75
Figura 16: Dilución (1/9) 1ml de inculo y 9ml de agua.....	75
Figura 17: Dilución (1/9) 1ml de inculo y 9ml de agua.....	76
Figura 18: Preparación del Inculo.....	76
Figura 19: Pretratamiento del suelo. ....	77
Figura 20: Preparacion de los tratamiento e inoculación de pseudomonas aeruginosa....	77
Figura 21: Toma de muestras de los tratamientos. ....	78
Figura 22: Determinación de Peso Seco de Pseudomonas aeruginosa .....	78

## **ABREVIATURAS**

**°C: Grados Celsius**

**%: Porcentaje**

**rpm: revoluciones por minuto**

**ml: Mililitros**

**L: Litros**

**mg: Miligramos**

**g: Gramos**

**kg: Kilogramos**

**mg/L: Miligramos por litro**

**g/L: Gramos por litro**

**API: American Petroleum Institute , gravedad API.**

**UFC/ml: Unidad Formadora de colonias**

**TPH: Hidrocarburos Totales de Petróleo**

**HAPs: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.**

**HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución.**

**LABICER: Laboratorio de Investigación y Certificaciones.**

## RESUMEN

El objetivo del trabajo de investigación fue determinar la capacidad biodegradadora de *Pseudomonas aeruginosa* en suelos contaminados por derrames de petróleo.

La muestra de suelo fue obtenida de la refinería de PETROPERÚ, localizada en el margen izquierdo del río Amazonas Iquitos y enviados al Laboratorio LABICER de la Universidad Nacional de Ingeniería para el análisis del contenido de hidrocarburos en el suelo (%), por Cromatografía de Gases con el método Extracción Soxhlet, en cada 50 g de suelo tenemos 0.845g de Tolueno.

Se aisló la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* de muestras de suelo contaminado por derrames de petróleo, en medio de cultivo Agar Cetrimide a 30°C, y seleccionamos las que tenían capacidad degradadora de Tolueno.

Para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* se realizó pruebas químicas (tinción gram y oxidasa positiva). Posteriormente evaluó 3 diferentes concentraciones de *Pseudomonas aeruginosa* ( $30 \times 10^4$ ), ( $30 \times 10^6$ ) y ( $30 \times 10^8$ ) UFCL/ml, el tratamiento 1, 2 y 3 llevaron 50 gramos de muestra de suelo contaminado por derrame de petróleo, 270ml de caldo triptona de soya y 30 ml caldo nutritivo con el inóculo, para el T1 ( $30 \times 10^4$ ), T2 ( $30 \times 10^6$ ), T3 ( $30 \times 10^8$ ) UFCL/ml, y el control (blanco) 300 ml de caldo triptona de soya y 50 g de suelo contaminado, cabe recalcar que cada tratamiento tuvo sus 3 réplicas, estos tratamientos fueron llevados a Shaker incubador a 150 rpm y a una temperatura de 35°C por 28 días, las muestras se tomaron cada 7 día y fueron enviadas al Laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes de la UNT.

De acuerdo a los análisis realizados en HPLC se demostró que existe una biodegradación a los 7 días de 0.385 g de Tolueno y se obtuvo una muestra final de degradación de un 0,01 g de tolueno a los 28 días de tratamiento, el mejor tratamiento fue T3 (tratamiento 3), con una concentración de  $30 \times 10^8$  de *Pseudomonas aeruginosa* en un período de 28 días.

**Palabras claves: biodegradación, hidrocarburos, bacterias gram negativa.**

## ABSTRACT

The main objective of the research work is to determine the biodegrading capacity of *Pseudomonas aeruginosa* in soils contaminated by oil spills.

The soil sample was obtained from the PETROPERÚ refinery, located on the left bank of the Iquitos Amazon River, and was sent to the LABICER Laboratory of the National University of Engineering for the analysis of the hydrocarbon content in the soil (%), by Chromatography of Gases with the Soxhlet Extraction method, in each 50 g of soil we have 0.845 g of Toluene.

The *Pseudomonas aeruginosa* bacterium was isolated from the contaminated soil samples, in Cetrimide Agar culture medium at 30°C, we selected the bacterium with the Toluene degrading capacity.

For the identification of *Pseudomonas aeruginosa*, chemical tests were performed (gram stain and positive oxidase). Subsequently, he evaluated 3 different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* ( $30 \times 10^4$ ), ( $30 \times 10^6$ ) and ( $30 \times 10^8$ ) UFC/ml, treatment 1, 2 and 3 carried 50 grams of soil sample contaminated by oil spill, 270 ml of tryptone broth of soybean and 30 ml of nutrient broth with the inoculum, for T1 ( $30 \times 10^4$ ), T2 ( $30 \times 10^6$ ), T3 ( $30 \times 10^8$ ) UFC/ml, and the control (blank) 300 ml of tryptone soybean broth and 50 g of contaminated soil, it should be noted that each treatment had its 3 replicates, these treatments were taken to a Shaker incubator at 150 rpm and at a temperature of 35 ° C for 28 days, the samples were taken every 7 days and were sent to the Clean Technology Laboratory and/or Emerging from the UNT.

According to the analyzes carried out in HPLC, it was shown that there is a biodegradation at 7 days of 0.385 g of Toluene and a final sample of degradation of 0.01 g of toluene was obtained at 28 days of treatment, the best treatment was T3 (treatment 3), with a concentration of  $30 \times 10^8$  UFC/ml of *Pseudomonas aeruginosa* in a period of 28 days.

**Keywords:** biodegradation, hydrocarbons, gram negative bacteria

## I. INTRODUCCION

Más de dos mil millones de toneladas métricas de petróleo son producidas por año en todo el mundo; una gran cantidad de los productos petrolíferos finales contaminan ambientes marinos y terrestres. Los grandes accidentes que se presentan en la industria del petróleo, como derrame de tanques, rupturas de tuberías y extracción de pozos, representan 10% de estas descargas, las cuales son más evidentes por la gran cantidad de hidrocarburos liberados en un sitio y tiempo determinado; sin embargo, el restante 90% es debido a descargas menores de las actividades industriales, que contaminan el suelo y son arrastradas por las aguas continentales. (Del Castillo & Mejía, 2015).

En el Perú existe un gran número de sitios contaminados por derrames de petróleo. Este hecho ha generado, en los últimos años, el interés de los gobiernos regionales y empresas privadas por la recuperación de estos sitios mediante tecnologías limpias. El conocimiento del tipo de contaminación y su concentración es fundamental para establecer las condiciones del sitio, el riesgo que representa y la selección de la técnica de biorremediación. (Del Castillo & Mejía, 2015).

El uso masivo del petróleo y sus derivados como fuente de energía y materia prima, ha ocasionado el fenómeno de la contaminación ambiental en todo el mundo, liberando diferentes gases tipo invernadero por el uso de combustibles. Además, se liberan al ambiente otros derivados como los policíclicos aromáticos, lo que produce un deterioro sostenido y progresivo en la calidad del medio ambiente, generando amenazas a la salud pública, así como la extinción de especies vegetales y animales (Valderrama, Tellez- Sosa, 20000)

Este tipo de contaminación genera cambios en las poblaciones microbianas presentes, provocando un stress que produce una selección y una disminución de la diversidad biológica (Rivera-Cruz, 2002). Esta diversidad se ve directamente influenciada por la complejidad de mezclas químicas presentes y por el periodo de tiempo que se encuentran expuestas a los contaminantes (Ara, 2004).

El petróleo derramado sufre procesos de evaporación, y de degradación natural en un proceso muy lento mediado por bacterias y/u otros microorganismos (Lomelí, Tamayo, 2000).

Para mejorar los procesos de biodegradación se suele añadir microorganismos autóctonos de la zona a ser remediada, que tienen una actividad degradadora comprobada. Por este motivo es importante mantener la búsqueda de diferentes organismos degradadores. Esta búsqueda nos permite seleccionar aquellos organismos que están más adaptados a diversas condiciones, como por ejemplo la capacidad de usar hidrocarburos como única fuente de energía (Borden, 1994), debido a la falta de trabajos relacionados con la biodegradación de petróleo nos planteamos el siguiente problema de investigación **¿Cuál será la concentración de *Pseudomonas aeruginosa* que tenga mayor capacidad biodegradadora de tolueno en suelos contaminados por derrames de petróleo crudo?**

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo general**

Determinar la capacidad biodegradadora de tolueno por *Pseudomonas aeruginosa* a concentraciones de ( $30 \times 10^4$ ,  $30 \times 10^6$  y  $30 \times 10^8$ ) UFC/ml, en suelos contaminados por derrames de petróleo crudo. Iquitos.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Aislar y seleccionar la cepa *Pseudomonas aeruginosa* de suelo contaminado por derrames de petróleo crudo.
- Evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de *Pseudomonas aeruginosa* sobre la actividad degradativa de Tolueno.
- Evaluar la cinética microbiana  $Y_{x/s}$ ,  $Q_x$ ,  $Q_s$  del control y de los experimentales.
- Determinar la concentración de *Pseudomonas aeruginosa* en la biodegradación de tolueno.

## **1.2 HIPOTESIS**

Se obtendrá una mayor biodegradación de Tolueno en la muestra de suelo contaminado por derrame de petróleo crudo al emplear una concentración de *Pseudomonas aeruginosa*  $30 \times 10^8$  UFC/ml

## **1.3 JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACIÓN**

El presente trabajo de investigación se justifica debido, a que en la zona de estudio existen derrames de petróleo los cuales son provocados o por falta de mantenimiento de los tubos que transportan el petróleo a través del oleoducto. el petróleo contamina el suelo, produciendo daño medio ambiental y pérdida de la flora y fauna, circundante. el petróleo por degradación natural genera la liberación del tolueno, el cual a 6°C se vaporiza y es muy inflamable y puede ser mortal en caso de ingestión y penetración de las vías respiratorias, a nivel de la piel provoca irritación cutánea, también provoca somnolencia o vértigo, puede dañar al feto y perjudicar los órganos internos por exposición prolongada.

## **1.4 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN**

El problema de la contaminación ambiental con petróleo es de vital importancia, ya que causa efectos perjudiciales en los ecosistemas terrestres y acuáticos. Por lo que se considera la importancia a nivel: académico, ambiental, salud

Nivel académico se quiere conocer la capacidad degradadora del tolueno,

Nivel ambiental biodegradar el tolueno para que no cause daño a la flora y fauna circundante

Nivel de la salud la biodegradación del tolueno permitirá tener menores casos de intoxicación y daños en el ser humano

## II. MARCO TEORICO

### 2.1 Antecedentes A nivel internacional

Cando M. (2011) Realizó estudios respecto a la degradación de Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) para ello se realizaron pruebas de actividad biológica y bioensayos considerando tres tratamientos T(1) terreno mineral y el microorganismo (*Streptomyces spp.*), T(2) Caldo de cultivo tripticasa de soya y microorganismo (*Streptomyces spp.*), T(3) consorcio microbiano no definido en caldo tripticasa de soya logrando degradar Naftaleno con un 98.31%, Fluoreno con un 98% de degradación, Antraceno con un 98.34% de degradación, Fluoranteno con un 97.06% de degradación, Pireno 98.50% de degradación y el Indeno presenta un 99.31% de degradación.

Mendo (2014) realizó estudios de degradación de hidrocarburos en sedimentos contaminados con bacterias autóctonas *Ochrobactrum anthropi* y demostró una degradación de 68.36% para ello se realizó el aislamiento en agar medio Bushnell Hass y luego pasado a un caldo cultivo puro pruebas de actividad biológica y bioensayos el tratamiento se dio en 72 horas a comparación del tratamiento sin bacterias se dio una degradación de 90 días.

#### 2.1.2 Antecedentes A nivel nacional

Abalos. et al. (2004). Mientras que a estudiaron los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10, determinando que la adición de los mismos, acelera la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en un 61% en 10 días de incubación

Haigler (1993) Aisló la cepa *Pseudomonas sp.* 4 NT de un suelo contaminado con 4-nitro benceno y comprobó que esta cepa bacteriana tiene también una buena capacidad degradativa frente al nitrotolueno. Los extractos celulares convirtieron el 4- nitrobenzoato a protocatecuato; la degradación se llevó a cabo bajo condiciones anaeróbicas.

Zucchi, et al., (2003). Evaluaron la respuesta de una comunidad bacteriana durante la biorremediación en un lapso de 72 días con bioestimulación y aireación

adecuada, adición de nutrientes y surfactantes obteniendo una reducción final de hidrocarburos del 39.5%.

Margesin y Schinner. (2001). Investigaron la factibilidad de la biorremediación, como tratamiento opcional de suelos contaminados con hidrocarburos. Para examinar la eficiencia de la atenuación natural y bioestimulación, utilizaron un mesocosmos tanto con suelos fertilizados y no fertilizados con NPK. El nivel inicial de contaminación fue reducido aproximadamente en un 50% y 70% en suelo no fertilizado y fertilizado respectivamente.

Machin, et al., (1999). Observaron el efecto de la bioestimulación en la biodegradación de hidrocarburos de suelo contaminado, en reactores de fase semisólida, encontrando que, mediante la adición de un fertilizante, se obtenía un elevado porcentaje de degradación. El suelo tratado presentaba altos niveles de contaminación por hidrocarburos; de esta manera la bioestimulación en fase sólida puede considerarse como alternativa para la biorremediación del suelo.

Morgan, et al., (2005). Aplicaron biorremediación en 20 m<sup>2</sup> de suelo contaminado con petróleo, durante 369 días, en este suelo se adicionaron nutrientes inorgánicos, aireación y humedad, obteniéndose valores < a 1% de concentración de hidrocarburos recomendada por normas internacionales.

Bracho , et al., (2004). Llevaron a cabo un estudio respecto a la degradación bacteriana sobre naftaleno, antraceno, fenantreno y dibenzotiofeno. Las bacterias degradadoras aisladas a partir del suelo estudiado fueron: *Pseudomonas* (54.05%), *Bacillus* (24.30%), *Staphylococcus* (16.20 %) y *Micrococcus* (5.4 %); además determinaron que el 100% de cepas, degradaron el naftaleno y antraceno, el 78.5% fenantreno, el 71.42% dibenzotiofeno y 50% los cuatro hidrocarburos.

Zucchi, et al., (2003). Evaluaron la respuesta de una comunidad bacteriana durante la biorremediación en un lapso de 72 días con bioestimulación y aireación adecuada, adición de nutrientes y surfactantes obteniendo una reducción final de hidrocarburos del 39.5%.

Escalante. (2002). Desarrolló un estudio sobre la biodegradación del crudo de petróleo en 3 terrarios durante 90 días, se aislaron 129 cepas bacterianas de las que presentaron una mejor actividad biodegradativa las especies: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus sp.* y *Serratia rubidae*, las mismas que conformaron el consorcio utilizado en ese experimento. En el primer terrario, donde se inoculó el consorcio exógeno sin fertilizantes, se logró una biodegradación del 92.5%, en el segundo terrario, que estuvo conformado por bacterias nativas, el porcentaje de biodegradación logrado fue del 60% y finalmente, en el tercer terrario que correspondía al control abiótico, la biodegradación fue del 55%.

Margesin y Schinner (2001). Investigaron la factibilidad de la biorremediación, como tratamiento opcional de suelos contaminados con hidrocarburos. Para examinar la eficiencia de la atenuación natural y bioestimulación, utilizaron un mesocosmos tanto con suelos fertilizados y no fertilizados con NPK. El nivel inicial de contaminación fue reducido aproximadamente en un 50% y 70% en suelo no fertilizado y fertilizado respectivamente.

Nwachukwu. (2001). Inoculó *Pseudomonas putida* en suelos contaminados con petróleo, adicionando nutrientes inorgánicos en algunos. La mayor efectividad de degradación se obtuvo a las 9 semanas, esto se corroboró por el crecimiento de *Lepidium sp.*, usado como evidencia de biorrecuperación; el porcentaje de germinación de éste, fue de 27,5% en suelos no fertilizados y de 98,8% en suelos fertilizados.

Parales (2000). Evaluó la capacidad degradativa y reacción quimiotáctica de cinco cepas, determinando que *Pseudomonas*, degrada de manera eficaz los hidrocarburos.

Arenas, (1999), 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.*

Merino, (1998) realizó el estudio de microorganismos nativos productores de emulsificante de petróleo aislando microorganismos a partir de muestras de suelo y agua procedentes de la refinería “La Pampilla” y evaluando la capacidad degradativa de la mismas mediante la actividad degradativa y emulsificante y concluyó que existe un elevado porcentaje de microorganismos nativos con capacidad de degradar hidrocarburos de petróleo y de producir emulsiones de este producto en agua en ambientes contaminados, y que los microorganismos con mayor capacidad degradativa fueron *Pseudomonas aeruginosa* KT1-1 y *Serratia rubida* II BT5-4.

Rentería y Miranda, (1998), 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, (1998), realizaron el aislamiento y evaluación del crecimiento de *Pseudomonas spp*, hidrocarburoclásticas en petróleo diésel 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.

Belloso, et al., (1998), inocularon suelos landfarming con tres tipos de cepas bacterianas: W1, W2, W3 aisladas del mismo suelo contaminado y propagadas en el laboratorio. Ellos aplicaron dos tipos de fertilizantes de tipo NPK (Nitrógeno, Fósforo y Potasio): Z1 con una relación C/N (Carbono - Nitrógeno) de veinte, la

relación NPK: 20:2:1, fuente de Nitrógeno  $\text{NH}_4$  (amonio) y Z2 con una relación C/N 100, la relación NPK: 20:20:1, fuente de Nitrógeno  $\text{NH}_4$  y mantuvieron los suelos a la intemperie durante noventa días. Ellos observaron una mayor reducción en la concentración de hidrocarburos en los primeros treinta días, la cual fue 45% en uno de los terrarios, que contenía la cepa W2 y fertilizante Z2. El porcentaje de degradación en el terrario control abiótico fue 8 %, mientras que el terrario que contenía el consorcio nativo, presentó un porcentaje de biodegradación del 12 %.

Leahy y Colwell, (1990), según varias publicaciones de estudios taxonómicos sobre los géneros de cepas bacterianas degradadoras, aisladas de suelos y aguas marinas, concluyeron que los géneros más importantes de bacterias degradadoras son: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* y *Pseudomonas sp.*

## 2.2 MARCO CONCEPTUAL

El petróleo es una mezcla de compuestos orgánicos, principalmente hidrocarburos insolubles en agua. También es conocido como petróleo crudo o simplemente crudo. También se le conoce como oro negro. Es producto de la degradación anaeróbica de materia orgánica, durante largos períodos de tiempo y bajo condiciones de alta presión y temperatura, que la convierte en gas natural, crudo y derivados del petróleo. El petróleo crudo es una mezcla extremadamente compleja y variable de compuestos orgánicos, donde la mayoría de los ellos son hidrocarburos, que varían en peso molecular desde el gas metano hasta los altos pesos moleculares de alquitranes y bitúmenes. Estos hidrocarburos pueden presentarse en un amplio rango de estructuras moleculares: cadenas lineales y ramificadas, anillos sencillos, condensados o aromáticos. Los dos grupos principales de hidrocarburos aromáticos son los monocíclicos, el benceno (11%), tolueno (26%) y xileno (52%) (BTEX) y los hidrocarburos policíclicos (HAPs) tales como el naftaleno (37%), antraceno (36%) y fenantreno (27%).

El crudo de petróleo se caracteriza por ser una matriz contaminante que contiene una elevada diversidad de compuestos, por lo que es un sustrato ideal para evaluar el potencial catabólico de cepas microbianas (Prince, 1993).

### **2.2.1 Consecuencias Sobre El Ambiente**

Un derrame o descarga de hidrocarburo afecta básicamente a tres elementos del ambiente, los cuales son:

Elementos abióticos (suelo, formaciones del relieve, geomorfología, etc.).

Elementos bióticos (flora y fauna).

Elementos socioeconómicos (actividades humanas, pesca, agricultura, lugares de esparcimiento de clubes, de recreación, de turismo, etc.).

Hidrocarburos monoaromáticos. Se encuentran el benceno y sus alquilados (monoalquilados como el tolueno y dialquilados como los xilenos), formando la familia de los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad. (Contreras, 2014)

### **2.2.2 Petróleo Crudo Loreto**

En el Lote 1AB, se produce el crudo Loreto que es en realidad una mezcla de crudos livianos y pesados. En alguna oportunidad el Crudo Loreto llegó a tener más de 28 API (es una medida de densidad que, en comparación con el agua a temperaturas iguales, precisa cuán pesado o liviano es el petróleo). Hace varios años en un crudo con las siguientes características: API 18, % Azufre 1.2 %. El Crudo Loreto mayoritariamente era empleado en Refinería. Al ser un contrato de Servicio no hubo problema en su comercialización en tanto Petroperú era el consumidor del crudo. (ssecoconsulting, 2015)

### **2.2.3 Derrames Por La Actividad Petrolera**

En la actividad petrolera, las disposiciones y el manejo habitual de hidrocarburos y combustibles, en algunos casos conlleva a la contaminación del ambiente, cuando tanques, oleoductos y diversas instalaciones sufren daños. Los líquidos migran hacia el suelo, subsuelo (zona vadosa) y hacia el agua subterránea (zona saturada – acuífero) o superficialmente hacia un bajo topográfico o curso de agua, y sus componentes volátiles a la atmósfera (Carpio, 2007).

No solo las contaminaciones se producen por roturas de los sistemas de almacenaje o de transporte, sino que el mal manejo del producto puede provocar impactos negativos en la ecología regional (Cuartas, 2012).

El petróleo en el suelo, que pasa a considerarse como un contaminante, se convierte en un riesgo para la salud humana y el ecosistema. En algunos casos, la contaminación no solo provoca problemas de toxicidad, sino que además puede ocasionar grandes riesgos de explosiones y/o incendios.

La industria petrolera en su conjunto ha tenido un gran impacto negativo en materia ambiental (Cuartas, 2012).

Los derrames de petróleo afectan las propiedades físicas del suelo y especialmente las poblaciones naturales de microorganismos. En particular causan disminución en bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, encargadas de asimilar y reciclar nutrientes en los ciclos biogeoquímicos; al alterarse éstos, se afecta la fertilidad del suelo (M.Flores, 2011).

El índice del impacto microbiano de las bacterias mostró que al final de la prueba (219 h), en cada una de las cinco concentraciones de petróleo hubo un incremento exponencial de colonias bacterianas altamente significativo ( $P \leq 0.01$ ), 2 a 3.5 veces más abundantes que en el testigo. Se infiere un fenómeno de recolonización y adaptación al medio. A nivel macroscópico, en los tratamientos con mayor concentración de petróleo hubo menor diversidad de colonias, pero las poblaciones fueron significativamente mayores. También, en los tratamientos de mayor concentración del hidrocarburo, se observaron colonias bacterianas no presentes en el tratamiento testigo. Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre podrían adaptarse a condiciones adversas. La selección de las más aptas sería útil en la biorremediación o saneamiento de zonas impactadas por petróleo crudo (Vázquez-Luna, 2011)

Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre poseen la característica de adaptarse a condiciones adversas, por lo que pueden ser aptas en estudios de biorremediación de suelos contaminados por petróleo crudo. Se podrían seleccionar microorganismos tolerantes y degradadores de hidrocarburo útiles para el saneamiento de zonas impactadas (V.Luna, 2011).

### 2.3. LA BIODEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS

Los hidrocarburos presentan la particularidad de adsorberse rápida y fuertemente a las partículas del suelo. Esta peculiaridad junto con la gran variedad de hidrocarburos hace necesario concebir consorcios bacterianos que logran trabajar juntos para la descomposición natural de los contaminantes. Rahman *et al.* (2001) mostraron que la degradación de la gasolina alcanza un nivel óptimo al combinar apropiadamente los microorganismos, nutrientes inorgánicos y orgánicos y surfactantes, el todo asociado con buenas condiciones de oxigenación.

Hace diez años, el tolueno y otros compuestos volátiles se consideraban como muy poco tolerados por las cepas de *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Nocardia* disponibles en ese momento; para el benceno, ninguna cepa tolerante se conocía aún (Moriya; Horikoshi, 1993). Desde entonces, muchos estudios han demostrado que los compuestos volátiles son metabolizados por algunas cepas en medio anaerobio, relacionado con las reducciones de nitratos, sulfatos, hierro, óxido de manganeso y con la producción de metano. Diferentes alternativas de aceptores de electrones como el fumarato, el humus y las quinonas han sido igualmente propuestas (Burland; Edwards, 1998; Cervantes *et al.*, 2001; Franzmann *et al.*, 2002).

En medio aerobio, métodos paralelos como la condensación, la absorción sobre carbono activado y la oxidación térmica se aplican para captar y degradar los hidrocarburos volátiles (Li *et al.*, 2001). Estos métodos aprovechan que los microorganismos que se encuentran inmovilizados sobre algunas superficies ideales bajo forma de *biofilms*, se encuentran menos expuestos a la toxicidad de los compuestos volátiles y soportan concentraciones mayores del agente contaminante (Franzmann *et al.*, 2002).

Algunas pruebas han permitido verificar que mezclados, el tolueno es degradado antes que el benceno (fenómeno llamado *preferential biodegradation*) (Franzmann *et al.*, 2002). Para una degradación más rápida y completa es preferible degradarlos a partir de su forma pura antes que en presencia de otros hidrocarburos (Greene *et al.*, 2000).

La baja solubilidad de los hidrocarburos en medio acuoso necesita la acción de surfactantes para incrementar su biodisponibilidad y su metabolización por los microorganismos (Harris, 1997). Como el efecto de los emulsificantes químicos sobre las bacterias y la dispersión de los hidrocarburos no está muy claro, es preferible trabajar con

cepas que producen un bioemulsificante a la vez que degradan los hidrocarburos. Ha sido comprobado por varios autores que los surfactantes de origen químico pueden provocar una inhibición del crecimiento de los microorganismos y una disminución del rendimiento de la biodegradación. Su fuerte actividad tensoactiva disminuye la estabilidad de las membranas celulares y produce una lisis celular. Sin embargo, los biosurfactantes producidos por los microorganismos degradadores no son tóxicos para estos (Lepo *et al.*, 2001).

Debe también considerarse el problema de la concentración residual de los contaminantes después de su degradación. Este residuo permanece sin importar el tratamiento aplicado, pero debe ser minimizado. Por esto, Nocentini, Pinelli y Fava (2000) recomiendan los consorcios bacterianos en vez de los cultivos puros. Juntas, varias bacterias pueden degradar varios hidrocarburos del diésel o del petróleo hasta obtener un residuo mínimo. (Wayens, 2004)

### **2.3.1. Biodegradación De Compuestos Aromáticos**

Compuestos naturales que están siendo extraídos de sus depósitos y convertidos en una forma biodisponible que resulta tóxica para los seres vivos, como es el caso de los hidrocarburos de los combustibles fósiles.

Un grupo particular de estas sustancias contaminantes está formado por compuestos aromáticos tóxicos, en especial los hidrocarburos aromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX)) para la producción de pesticidas, plásticos y fibras sintéticas (Young & Cerniglia, 1995) .

La estructura de las moléculas aromáticas dota a estas compuestos de una alta estabilidad, lo que eleva su persistencia en el medio ambiente e incrementa su capacidad contaminante (Dagley, 1986).

Para luchar contra la contaminación de forma más eficiente y que consiste en aprovechar las capacidades degradadoras de los microorganismos, que, con su enorme capacidad de adaptación habilitan distintas rutas metabólicas que les permiten degradar distintos contaminantes (Smith, 1990; Harayama y col., 1992; van der Meer y col., 1992), los procesos catabólicos microbianos implicados en la degradación de moléculas contaminantes, así como para desarrollar artificialmente nuevas rutas catabólicas capaces de degradar a éstas últimas, han dado lugar a una disciplina que recibe el nombre genérico de Biodegradación/Biorremediación (Ramos y col., 1994; Pieper y Reineke, 2000).

USEPA (2003). Considera los principales constituyentes derivados del petróleo Dicloetileno, Tetracloroetileno, Tricloetano, Dicloroetano, Diclorobenceno Dicloropropano, Dicloropropeno, Clorofenol, Triclorofenol, Diclorofenol Triclorobenceno, Diclorobenceno, Dioxano, Acenafteno, Acetona, antraceno, Benceno, Tolueno

En el caso de los hidrocarburos aromáticos, la degradación del benceno es similar a la de los otros aromáticos de tolueno y del xileno. El benceno es digerido por las dioxigenasas que provocan la ruptura del núcleo por hidroxilación de manera que la molécula sea químicamente más accesible. Esta reacción se presenta en la figura 1 (Rittman, 1994).

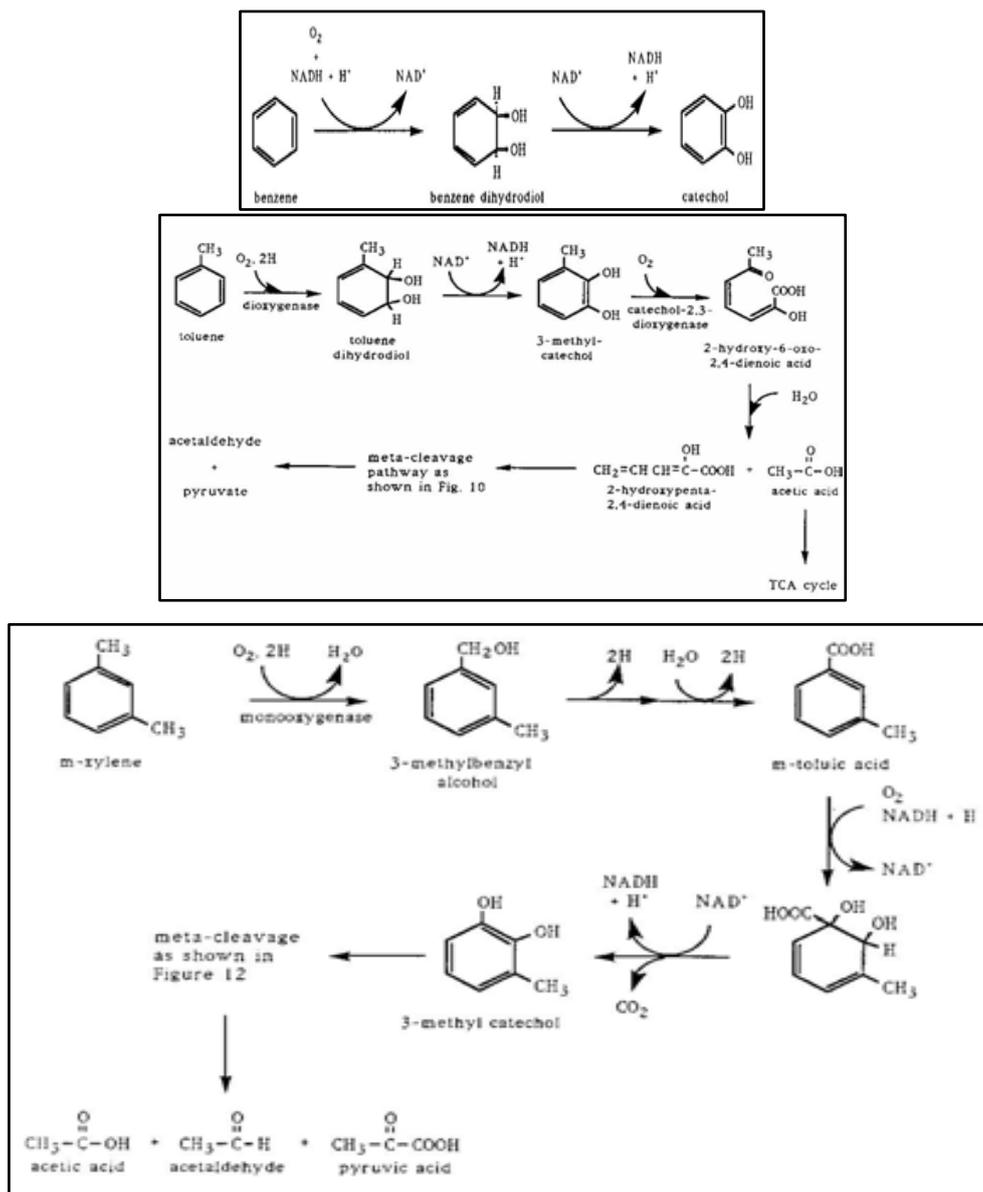


Figura 1: Reacción de degradación del benceno, del tolueno y del xileno

(Rittmann & Seagren , 1994)

Otra de las rutas existentes para la degradación de Tolueno es la ruta TOD, que fue descrita por primera vez para la cepa *Pseudomonas putida* (Gibson et al., 1970).

Esta cepa degrada tolueno a través de una ruta en la que en el primer paso se forma el compuesto *cis*-2-3-dihidro-2,3-dihidroxitolueno, a través de una reacción de dioxigenación llevada a cabo por el tolueno dioxigenasa.

*Pseudomonas putida* DOT es capaz de usar el tolueno, benceno y etilbenceno como única fuente de carbono y energía a partir de ruta TOD.

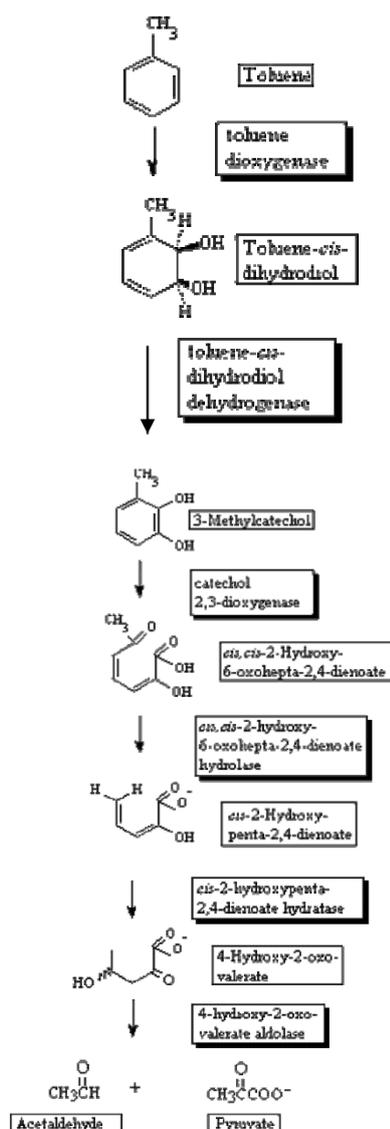


Figura 2: Rutas de degradación de tolueno por *Pseudomonas aeruginosa*. Fuente:

Tomada de Biocatálisis de PubMed 2011

### 2.3.2 Las Bacterias Degradadoras De Hidrocarburos

Las poblaciones bacterianas que se encuentran en mayor cantidad en los lugares contaminados se adaptan al medio gracias a que poseen características metabólicas que les permiten usar como fuente de carbono al contaminante o una fracción de este cuando la fuente de carbono al contaminante o una fracción del mismo. Cuando la fuente de carbono es un substrato insoluble como un hidrocarburo, los microorganismos facilitan la biodisponibilidad produciendo sustancias como carbohidratos, ácidos grasos, enzimas y biosurfactantes.

Se ha logrado identificar una gran variedad de microorganismos con la capacidad de degradar compuestos derivados del petróleo (Valderrama. Téllez- Sosa 2000).

Organismo	Sustancia
<i>Pseudomonas putida</i>	n-C <sub>6</sub> n-C <sub>10</sub>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n-C <sub>6</sub> n-C <sub>17</sub>
<i>Acinetobacter sp</i>	C <sub>10</sub> -C <sub>20</sub>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	C <sub>14</sub>
<i>Pseudomona sol 20</i>	n-C <sub>2</sub> -C <sub>12</sub>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	n-C <sub>1</sub> - C <sub>22</sub> trimethylmethan 2-2 Dhymetil propan 2-Methybutan 2-3 Methybutan
<i>Pseudomona sp</i>	Naphtalin
<i>Escherichia coli</i>	Benz(a)Pyren
<i>Mycobacterium sp</i>	Piren
<i>Pseudomona butanovora</i>	n- butan
<i>Morasella species</i>	Benzol
<i>Morasella species</i>	Benzol
<i>Pseudomona paucimobilis</i>	Phenantheren
<i>Pseudomona vesicularis</i>	Fluoren
<i>Pseudomona putida</i>	Benzol
<i>Pseudomona putida</i>	Toluol

Tabla1: Organismos que intervienen en el proceso de degradación (Olivier: Margot 2005).

No todos los compuestos de petróleo se degradan con la misma facilidad por los microorganismos del suelo. Se tiene las siguientes generalizaciones para la biodegradación de hidrocarburos: Los compuestos alifáticos de cadena lineal (parafínicos) se degradan más fácilmente que los compuestos aromáticos. (M.Adriana, 2011)

La actividad biológica de los microorganismos altera la estructura molecular de los hidrocarburos de petróleo en diversos grados. Cuando la descomposición del compuesto orgánico lleva a la formación de una forma intermedia menos tóxica ocurre una biotransformación. Cuando se logra la descomposición a dióxido de carbono, agua y compuestos celulares se logra la mineralización. Ambas reacciones se producen durante la biodegradación. (Ríos, 2012)

### **2.3.3. *Pseudomonas Aeruginosa***

Es una bacteria gram-negativa pertenece a la familia *Pseudomonaceae*. Se trata de un bacilo recto o ligeramente curvado Gram negativo, con un tamaño de 2–4 x 0,5-1 micras, y móvil gracias a la presencia de un flagelo polar crecen entre 10 y 42°C Estas bacterias crecen en áreas húmedas, en relación con su metabolismo, es aerobio (aunque puede desarrollarse en condiciones anaerobias utilizando nitrato), catalasa positiva y oxidasa positiva. Se caracteriza por producir una variedad de pigmentos, como la piocianina (de color azul verdoso), la pioverdina (pigmento fluorescente de color verde amarillento) y la piorrubina (de color rojo), la mayoría de las cepas presentan un olor característico similar a la uva o una fruta madura. (Databio, 2016)

Se ha reportado el aislamiento de *P. aeruginosa* de Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrimentos que otros organismos pueden asimilar. ambientes tan inhóspitos como son el combustible. (Soberón, 2014)

## **2.4. FACTORES QUE DETERMINAN EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN**

### **2.4.1. Oxígeno (O<sub>2</sub>).**

La disponibilidad de oxígeno es necesaria para la bio-oxidación de los compuestos orgánicos. Las reacciones de oxidación son las de mayor importancia en la biodegradación de los hidrocarburos, las condiciones aerobias en el suelo, además redistribuye los nutrientes, contaminantes y microorganismos, favoreciendo la degradación de los contaminantes. La frecuencia de aireación del suelo dependerá del tipo de suelo y la concentración de contaminantes.

#### **2.4.2. Humedad (H)**

La humedad es necesaria para el crecimiento adecuado de los microorganismos del suelo, pero a su vez una excesiva humedad puede reducir la disponibilidad de oxígeno. La USEPA (1995) recomienda mantener la humedad del suelo en el rango de 40% a 85% de la capacidad de campo. Guerrero (1993) señala que es conveniente mantener una humedad del orden del 70% de la capacidad de campo.

#### **Potencial de Hidrogeno (pH)**

Para mantener el crecimiento de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, el pH del suelo debe tener valores en el rango de 6 – 8 (USEPA, 2003). Valores de pH mayores a 6,5 minimizan la solubilización y migración de los metales pesados y proveen las condiciones óptimas para la biodegradación. Si los suelos tuvieran valores de pH muy bajos se sugiere emplear cal como material encalante.

#### **2.4.3. Temperatura (T°)**

La temperatura tiene una influencia importante en la tasa de degradación de los hidrocarburos, debido a que el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos están en función de esta. La USEPA (2003) indica que, en el rango de 10 a 45°C, la actividad microbiana se duplica cada 10 °C, siendo el rango óptimo para el proceso de biodegradación.

#### **2.4.4. Nutrientes**

Los microorganismos requieren de nutrientes inorgánicos como nitrógeno y fósforo para mantener su crecimiento. En general, se recomienda agregar nutrientes usando fertilizantes agrícolas comerciales como urea, nitrato de amonio o superfosfato triple. Dichos compuestos pueden adicionarse en solución junto con el riego o en forma seca incorporándose mediante el volteo de los suelos con la maquinaria agrícola. La dosificación de nitrógeno y fósforo se realiza en función de la concentración de contaminante de acuerdo a una relación que vincula C: N: P y que varía según los autores. La USEPA (2003) sugiere una relación 100:1, 10:1, 1:0,5.

#### **2.4.5. Textura del suelo**

Guerrero (2001). La textura del suelo afecta la permeabilidad, el contenido de humedad y la densidad del suelo. Para asegurar que la disponibilidad de oxígeno, la distribución de

nutrientes y el contenido de humedad se mantengan en rangos efectivos para la biodegradación es importante conocer la textura, la estructura y composición de los suelos.

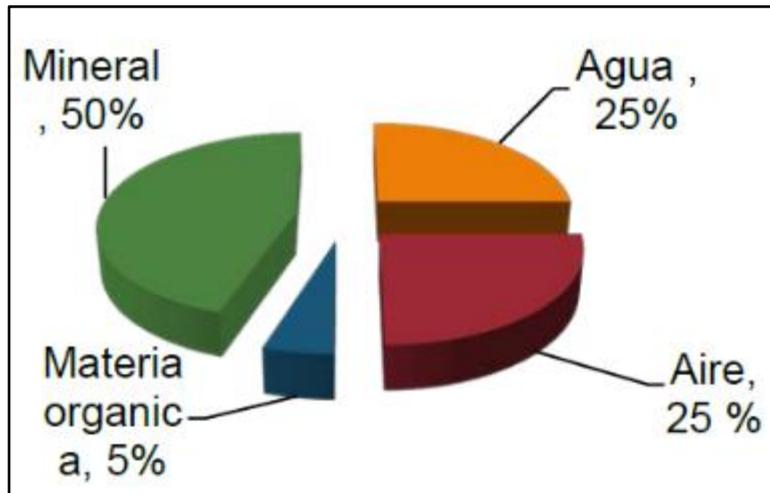


Figura 3: Composición del suelo. Fuente: Portal de Suelos FAO 2006

## 2.5. TASA DE BIODEGRADACION

La tasa de biodegradación de los contaminantes dependerá de la estructura química de los mismos. Mientras más compleja es la estructura molecular del contaminante su biodegradación será más lenta (Arbeli, 2009).

En general los compuestos alifáticos de bajo peso molecular y los constituyentes monos aromáticos son degradados con mayor facilidad que los compuestos alifáticos de alto peso molecular y poli aromáticos (Hilderbrando, 2012).

De otro lado, cuando la concentración del contaminante es alta se puede producir inhibición del desarrollo microbiano (disminuyendo su capacidad de metabolización) o si es muy alta que intoxique a los microorganismos y estos mueran. Asimismo, esta organización indica que por encima del 30 por ciento se han observado casos donde la velocidad es muy baja pero no nula (Usepa, 2003).

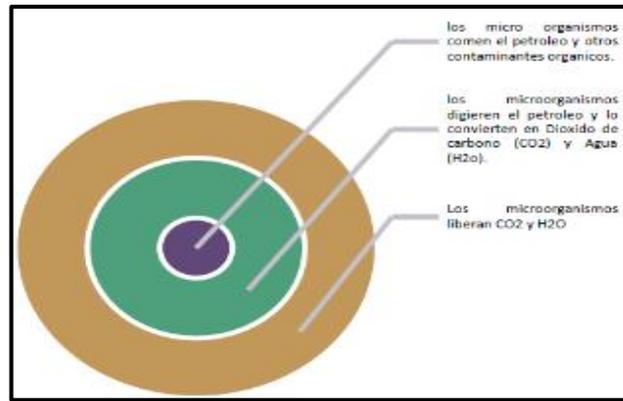


Figura 4: Proceso de degradación de hidrocarburo. Fuente: Portal de Suelos FAO

2006

## 2.6. TOLUENO

Es un líquido incoloro con un olor característico. El tolueno ocurre en forma natural en el petróleo crudo y en el árbol tolú. El tolueno o metilbenceno  $C_6H_5CH_3$  es un hidrocarburo aromático desde un punto de vista químico, el tolueno se produce en la llamada ciclo de hidrogenación del n-heptano, cuando éste se encuentra en presencia de los catalizadores. Se consigue también como un subproducto en la fabricación de compuestos como el etileno o el propeno. (ATSDR, 2016)

El tolueno tiene una producción mundial de entre 5 a 10 millones de toneladas al año. Además de su uso como materia prima, el tolueno se añade a diferentes combustibles, siendo usado como antidetonante. También es ampliamente usado como disolvente de pinturas, barnices de celulosa, diluyente de tintas fotograbado, caucho y resinas, asfalto, brea y acetilcelulosas, se utiliza en la fabricación de detergentes, productos de limpieza. Es una importante materia prima para síntesis orgánicas, como las de cloruro de benzoilo, sacarina, cloramina y un gran número de colorantes (Wikilibros, 2017).

Posee uso en los materiales adhesivos, así como diluyente en un tipo de lacas, las nitro celulósicas. El tolueno es el material de partida para la sintetización del famoso explosivo 2,4,6-trinitrotolueno (TNT). Y en general podemos decir que el tolueno es ampliamente utilizado como disolvente en las síntesis (Mendez, 2010).

Fórmula semidesarrollada	$C_6H_5CH_3$
Fórmula molecular	$C_7H_8$
Masa molecular	92,1381 g/mol
Densidad	866,9 kg/ m <sup>3</sup> ; 0.8669 g/ cm <sup>3</sup>
Punto de fusión	178,2 K (-95 °C)
Punto de ebullición	383,8 K (111 °C)
Temperatura crítica	591,64 K (318 °C)
Viscosidad	0.59 cup a 20°C
Punto de inflamación	6°C
Límites de explosividad	1,2-7%V
Umbral de olor	0,2 ppm
Solvólisis	En agua: 0,57g/L a 20-25°C
	En agua de mar: 0,38g/L
	Su solubilidad es ilimitada en cloroformo, acetona y éter
Factor de conversión	1ppm=3.83 mg/m <sup>3</sup>
	1mg/m <sup>3</sup> = 0,261 ppm

*Tabla2: Datos Físicos y químicos del Tolueno*

A pesar de su amplia aplicación, el tolueno es bastante nocivo, muy tóxico (aunque, aun así, su toxicidad sigue siendo menor a la del benceno), pues los anillos aromáticos que se oxidan generando epóxidos, los cuales se sabe que poseen actividad cancerígena en el benceno (R.Raul, 2012).

## **2.6.1. Efectos Sobre La Salud**

### **2.6.1.1 Por inhalación:**

El Tolueno se puede oler a partir de concentraciones alrededor de las 8 ppm, que es un valor muchas veces menor a los valores considerados como peligrosos por diferentes instituciones internacionales y por tal razón se considera que el olor es una buena forma de advertencia ante peligros respiratorios que se puedan presentar con esta sustancia. en estos casos las concentraciones de Tolueno en el aire pueden llegar a alcanzar con facilidad valores de 20.000 o 30.000 mg/m<sup>3</sup> (Disease, 2011).

Los vapores del Tolueno son más pesados que el aire y tienden a permanecer en niveles cercanos al suelo; de esta manera, pueden causar asfixia en lugares cerrados,

pobrementemente ventilados o en áreas bajas donde se puede acumular. Los vapores que provoca el tolueno tienen efectos narcóticos e irritantes. Respirar grandes cantidades de tolueno afecta negativamente al sistema nervioso humano, los riñones, el hígado y el corazón. Si se inhalan en gran cantidad pueden llegar a provocarnos la muerte en el peor de los casos. El tolueno debe encontrarse dentro de unas concentraciones máximas permitidas, estas son de 50 partes por millón en las zonas de trabajo con el producto (Alberto, 2016).

Humanos expuestos a 200 ppm por 8 horas presentaron fatiga, debilidad, confusión, lacrimación e irritaciones musculares; a 600 ppm por 8 horas también se presentó euforia, dolor de cabeza, mareo, dilatación de pupilas y náusea; a 800 ppm por 8 horas los síntomas fueron más pronunciados y los efectos posteriores incluyeron fatiga muscular e insomnio por varios días (Mondragón, 2015).

De forma aguda por exposiciones de 100 ppm seis horas al día por cuatro días se presentan efectos en el sistema nervioso central (dolor de cabeza, mareo, intoxicación) e irritación ocular. Exposición por 8 horas al día en los mismos cuatro días a la semana provoca los mismos efectos anteriores y otros más graves que incluyen euforia, pupilas (Trabajo, 2007).

#### 2.6.1.2 Contacto Piel/Ojos

La absorción de Tolueno por la piel se puede presentar ya sea por el contacto con Tolueno en forma líquida o por el contacto con sus vapores. Por esta vía se absorbe de forma más lenta que en comparación con la inhalación o la ingestión y su valor puede estar en el intervalo de 14 a 23 mg/cm<sup>2</sup> /hora. El Tolueno que se absorbe por la piel se distribuye por todo el organismo igual que en el caso respiratorio y de la misma forma se puede eliminar por la orina o por su exhalación en la respiración (Toxicological Profile for Toluene, 2014).

En los ojos el Tolueno puede ingresar por la presencia de vapores en el ambiente o por salpicaduras accidentales. El vapor de Tolueno es solo ligeramente irritante para las membranas mucosas; no obstante, si está en forma líquida puede generar lesiones en la córnea. La irritación ocular por causa de vapores de Tolueno se

inicia a partir de concentraciones cerca de 300 ppm (Toxicological Profile for Toluene, 2014)

Las salpicaduras en los ojos causan por lo general dolor y sensación de ardor, conjuntivitis, espasmos en los párpados e inflamación de la córnea humanos expuestos a Tolueno entre 6 y 8 horas a concentraciones de 100 ppm desarrollan irritación ocular irritación conjuntiva y daño en la córnea, pero sin pérdida de la visión (Medical Management Guidelines (MMGs), 2014).

#### 2.6.1.3 Ingestion

La exposición a Tolueno por ingestión en pequeñas cantidades resulta de beber agua contaminada o comer alimentos preparados con agua contaminada, también es posible la ingestión por la contaminación directa de los alimentos con Tolueno (Toxicological Profile for Toluene, 2014).

El Tolueno se puede detectar por el sentido del gusto a partir de concentraciones entre 0,04 y 1 ppm; cuando se ingiere, se absorbe completamente en el tracto gastrointestinal y comparte el mismo camino que aquel que entra por la inhalación o por la piel, eliminándose por la respiración y por la orina de forma directa en el estómago luego de una ingestión aguda de Tolueno se presenta irritación estomacal, náusea, vómito y diarrea. Si el Tolueno se absorbe y distribuye por el organismo se produce depresión severa del sistema nervioso central que puede generar la muerte por asfixia o falla cardíaca en el individuo expuesto (Public Health Statement Toluene, 2015).

## 2.7. COMPORTAMIENTO EN EL MEDIO AMBIENTE DEL TOLUENO

### 2.7.1. Agua:

El tolueno es una amenaza para el agua. Por su volatilidad escapa parcialmente a la atmósfera, pero su solubilidad en agua es suficiente para provocar problemas de contaminación en los cuerpos de agua superficiales y subterráneos (RIPPEN, 1989).

### **2.7.2. Aire:**

La mayor parte del tolueno que se libera al medio ambiente va a la atmósfera, debido a su elevada presión de vapor. La degradación es bastante eficiente, de manera que muy poca cantidad de esta sustancia vuelve al suelo por deposición seca o mojada (RIPPEN, 1989).

### **2.7.3. Suelo:**

El tolueno se adsorbe, fundamentalmente, a partículas de arcilla y materia orgánica. La capacidad de adsorción aumenta a medida que disminuye el pH. Si no se derrama en grandes cantidades, el tolueno que ha ingresado al suelo escapa hacia la atmósfera o sufre transformaciones químicas y biodegradación (RIPPEN, 1989).

### **2.7.4 Degradación, productos de la descomposición y tiempo de vida media:**

Se estima que el tiempo de vida media del tolueno en el aire es de aproximadamente 60 horas (reacciona con los OH). El tiempo de persistencia durante el verano en climas nórdicos es de unos 4 días, en tanto que en el invierno este período se extiende a varios meses; en los trópicos, oscila entre algunos días y algunas semanas independientemente de la estación del año (RIPPEN, 1989).

## **2.8 Propuesta experimental**

El suelo es un medio muy importante para el desarrollo fundamental de ciertas actividades, como la agricultura, que se ven afectadas por accidentes de derrame de hidrocarburos o porque efecto produce un mal proceso de extracción del mismo; por lo expuesto, el presente trabajo tiene la finalidad de buscar metodologías o técnicas más efectivas para remediar suelos que hayan sido contaminados por derivados de hidrocarburos. Para ello, se llevará a cabo un experimento que estudiará la capacidad biodegradadora de Tolueno por *Pseudomonas aeruginosa*; se aplicará diferentes concentraciones de la bacteria en los suelos contaminados por derrames de petróleo donde se verá la efectividad de las bacterias nativas para degradar el Tolueno.

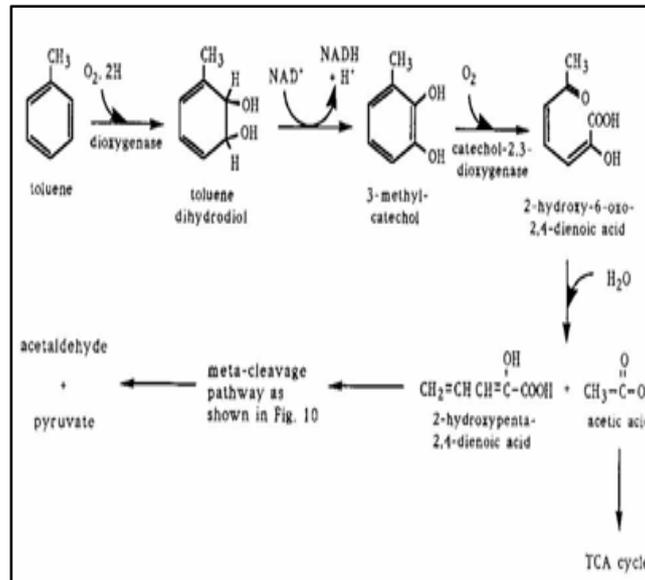


Figura 5: Ruta Metabólica del Tolueno Fuente: Tomada de Biocatálisis de PubMed 2011

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Recolección del suelo contaminado.

La investigación realizada es experimental por el cual se realizó un muestreo aleatorio simple del suelo contaminado, la toma de muestra fue a una profundidad de 10 cm, las muestras fueron extraídas de la Refinería de PETROPERÚ, localizada en la margen izquierda del río Amazonas, a 14 kilómetros de la ciudad de Iquitos, capital de la provincia de Maynas, en la Región Loreto. Se tuvo algunas inconvenientes al momento de la toma de muestra debido a que las autoridades de Petro Perú no estaban presentes, vigilancia solo permitió tomar muestras de la parte externa de la refinería.



Figura 6:Ubicación de la refinería Petro Perú. Fuente Google maps. -3.631973,-73.203421.

Para la recolección de las muestras se empleó equipos de protección personal (EPP): Guantes, mascarilla, casco de seguridad, botas, guardapolvo, espátula, balde de 15 litros, bolsas herméticas y un marcador, además se codificó la muestra respectivamente (lugar, tipo de muestra, fecha y hora).

Se recolectó 20 Kg de muestra en el balde de 15 litros y 500 g en 2 bolsas herméticas. (Eca N° 003-2014-MINAM), el transporte se ejecutó a temperatura ambiente.

Para la cuantificación inicial de Tolueno por Cromatografía de Gases, se envió 1kg de muestra de suelo contaminado por derrames de petróleo crudo pesado al Laboratorio de Investigación y Certificaciones –LABICER, de la Universidad Nacional de Ingeniería Facultad de Ciencias (Domínguez & Lecca 2022).

### **3.1.1 Preparación del suelo contaminado para la extracción de hidrocarburos.**

Se realizó un pre tratamiento al suelo contaminado el cual consistió en triturar el suelo hasta volverlo suave, secarlo a medio ambiente por 4 horas para luego ser llevado a la estufa marca Felisa a 100 °C durante 8 horas, hasta que la muestra pierda toda la humedad. En esta etapa eliminamos microorganismos presentes en el suelo para evitar una competencia con nuestra bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

Posteriormente, retiramos el suelo de la estufa y se colocó en un desecador para que tome la temperatura ambiente, después la muestra fue pesada nuevamente, registrando el peso final. El porcentaje de humedad se determinó por la diferencia de pesos utilizando la siguiente fórmula. (Fernández 2006)

$$\% \text{ humedad} = (\text{peso inicial} - \text{peso final}) / (\text{peso inicial}) * (100)$$

## **3.2 Aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa***

### **3.2.1 Preparación del medio Agar Cetrimide**

Se preparó medio de cultivo Agar Cetrimide específico para *Pseudomonas aeruginosa*. Composición química del medio Agar Cetrimide (70 ml), Cetrimide (3.29 g/Glicerol (0.7ml), Agua Destilada (70ml) y Fenazopiridina (0.0015ml).

Se llevó a la cocina a calentar a ebullición para disolver el medio por completo.

Luego se esterilizó en autoclave a 1 atm de presión (121 ° C) durante 15 minutos

### **3.2.2 Aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa***

El aislamiento consistió en agregar 50 g de sedimento (muestras de suelo contaminado de la refinería de PETROPERU –Iquitos) en un vaso precipitado de 250 ml, después se adicionó 100 ml de suero fisiológico, homogenizar hasta disolver el suelo en la solución, luego fue colocada en la Incubadora a 30 °C por 24 horas. Después de 24 horas tomar asadas de la solución (50 g suelo contaminado + 100 ml solución salina) y realizar siembra por estrías en placas Petri con medio de cultivo Agar Cetrimide específico de *Pseudomonas aeruginosa* (Domínguez & Rosales 2022).

### **3.2.3 Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* en Agar Cetrimide**

Se preparó medio de cultivo Agar Cetrimide específico para *Pseudomonas aeruginosa*. Composición química del medio Agar Cetrimide (200 ml), Cetrimide (9.4 g/Glicerol (2 ml), Agua Destilada (200ml) y Fenazopiridina (0.0042ml).

Se llevó a la cocina a calentar a ebullición para disolver el medio por completo.

Se esterilizó en autoclave a 1 atm de presión (121 ° C) durante 15 minutos. (King, 2013). Luego realizar siembras por estrías en placas petri, llevar a incubación por 36 horas a una temperatura de 30°C.

### **3.3 Selección de cepas bacterianas *Pseudomonas aeruginosa***

Para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* se determinó por el análisis macroscópico y microscópico, y pruebas bioquímicas como tinción de Gram y oxidasa positiva, para determinar el género y la especie según el Manual Bergey's.14 L. Con la finalidad de confirmar la capacidad de biodegradación de *Pseudomonas aeruginosa* en la biodegradación de Tolueno, se cultivaron en 250 ml de medio HB (Bushnell Haas, 1941) con (1%) de Tolueno como única fuente de carbono. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente en un shaker a 150 rpm durante 48 horas. Se midió la densidad óptica de cada cultivo al inicio T(0) a las 24 horas (T<sub>24</sub>) y 48 horas (T<sub>48</sub>) a 600 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20 (Baush & Lomb).

### 3.3.1 preparación del medio de mantenimiento -medio agar glutamato.

Se peso Glutamato mono sódico (0.5g/L), Almidón soluble (1 g/L) Dihidrógenofosfato K (0.1 g/L), Sulfato de Magnesio (0,025 g/L), Rojo Fenol (0,018 g/L), Agar Bacteriológico (1 g/L), y adicionamos en un Matraz Erlenmeyer Agua Destilada (100 ml).

Se llevó a la cocina a calentar a ebullición para disolver el medio por completo. Se esterilizo en la autoclave a 1 atm de presión (121 ° C) durante 15 minutos (King W. R., 2003)

### 3.3.2 Siembra de *Pseudomonas aeruginosa* en Agar Glutamato.

A partir del cultivo bacteriano obtenido en el medio Agar Cetrimide, se tomó una azada y se realizó la siembra por estrías para la mantención de la cepa, en 4 placas Petri, también se realizó cultivo puro en 2 viales inclinados.

Se Incubo a una temperatura de 30°C por 24 horas. Luego se llevó a refrigeración a una temperatura de 3°C por 15 días, pasado los 15 días realizar subcultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (Gerard J. Tortora, 2007)

### 3.4 Establecimiento de la concentración inicial del inóculo

Para el establecimiento de la concentración inicial del inoculo primero se seleccionó el Tubo N° 6 de McFarland, a una concentración de  $18 \times 10^8$  UFC/ml que determina una turbidez establecida.

Se utilizó tubos de ensayo con solución salina fisiológica y se tomó asépticamente asadas del cultivo puro de *Pseudomonas aeruginosa* hasta llegar a la turbidez del tubo N° 6 ( $18 \times 10^8$ ), luego se hicieron diluciones para obtener las concentraciones de  $30 \times 10^4$ ,  $30 \times 10^6$  y  $30 \times 10^8$  UFC/ml (Rojas-Triviño, 2011)

**Dilución  $30 \times 10^8$ :** Se toma 5 ml de inoculo del Tubo N° 6 ( $18 \times 10^8$ ), y agregamos 1ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo estéril, obteniendo una concentración de  $15 \times 10^8$ , este proceso se realiza 2 veces para obtener 2 tubos de ensayo con la solución  $15 \times 10^8$ , posteriormente se unen las 2 diluciones de  $15 \times 10^8$  formando  $30 \times 10^8$  UFC/ml.

**Dilución  $30 \times 10^6$ :** Se toma 1 ml de inoculo de la concentración ( $15 \times 10^8$ ), y agregamos 9 ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo estéril, obteniendo una concentración de  $15 \times 10^7$ , en 2 tubos de ensayo agregamos 1 ml de inoculo de la

concentración ( $15 \times 10^7$ ), y agregamos 9 ml de agua destilada estéril obteniendo la concentración  $30 \times 10^6$  UFC/ml

**Dilución  $30 \times 10^4$ :** Se toma 1 ml de inóculo de la concentración ( $30 \times 10^6$ ), y agregamos 9 ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo estéril, obteniendo una concentración de  $30 \times 10^5$ , otra vez agregamos 1 ml de inóculo de la concentración ( $30 \times 10^5$ ), y agregamos 9 ml de agua destilada estéril obteniendo la concentración  $30 \times 10^4$  UFC/ml.

Se realizó peso seco para determinar g/L de células presente en cada concentración de *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3.5 Preparación del caldo de soja tripticasa.

Pesamos 8.5g del medio digerido de soja-caseína (medio de crecimiento eficiente en el cual los microorganismos presentan un mayor desarrollo) y se disolvió en 270 ml de agua destilada para cada réplica, para nuestro control se pesaron 9g y se disolvió en 300ml de agua destilada.

Se llevó a la cocina a calentar a ebullición para disolver el medio por completo.

Se esterilizó en la autoclave a 1 atm de presión ( $121^\circ \text{C}$ ) durante 15 minutos. (Farmacopea, 2008)

#### 3.5.1 Tratamiento en Matraces de 500ml.

- Se realizó 3 réplicas por cada concentración de *Pseudomonas aeruginosa*. Y se usó un testigo o control.
- En el tratamiento 1 se colocó en un matraz de 500ml, 270 ml de caldo tripticasa de soya+ 50g de suelo contaminado con petróleo crudo + 30 ml de *Pseudomonas aeruginosa* ( $30 \times 10^4$  UFC/ml), se harán 3 repeticiones.
- En el tratamiento 2 se colocó en un matraz de 500ml, 270 ml de caldo tripticasa de soya+ 50g de suelo contaminado con petróleo crudo + 30 ml de *Pseudomonas aeruginosa* ( $30 \times 10^6$  UFC/ml), se hizo 3 repeticiones
- En el tratamiento 3 se colocó en un matraz de 500ml, 270 ml de caldo tripticasa de soya+ 50g de suelo contaminado con petróleo crudo + 30 ml de *Pseudomonas aeruginosa* ( $30 \times 10^8$  UFC/ml), se hizo 3 repeticiones

- En otro matraz de 500 ml se realizó un blanco el constará de 300 ml de caldo tripticasa de soya+ 50g de suelo contaminado con petróleo crudo.
- Para la toma de muestra se utilizó Mascarilla para evitar la inhalación directa del Tolueno. Al día 7, 14, 21 y 28 días por cada tratamiento, se hicieron tomas de muestra de 5ml, para la cuantificación de g/L de Tolueno presente en la muestra, que se realizó por HPLC en el Laboratorio de Investigación de Tecnologías Limpias y Emergentes - UNT
- Para determinar los g/L de *Pseudomonas aeruginosa* en cada toma de muestra, se realizó peso seco.

TRATAMIENTOS			
Replicas	T1	T2	T3
R1	270 ml de caldo tripticasa de soya+ 50g de suelo contaminado con petróleo crudo + 30 ml de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( $30 \times 10^4$ )	270 ml de caldo tripticasa de soya+ 50g de suelo contaminado con petróleo crudo + 30 ml de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( $30 \times 10^6$ )	270 ml de caldo tripticasa de soya+ 50g de suelo contaminado con petróleo crudo + 30ml de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( $30 \times 10^8$ )
R2	270 ml de caldo tripticasa de soya+ 50g de suelo contaminado con petróleo crudo + 30 ml de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( $30 \times 10^4$ )	270 ml de caldo tripticasa de soya+ 50g de suelo contaminado con petróleo crudo + 30 ml de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( $30 \times 10^6$ )	270 ml de caldo tripticasa de soya+ 50g de suelo contaminado con petróleo crudo +30 ml de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( $30 \times 10^8$ )
R3	270 ml de caldo tripticasa de soya+ 50g de suelo contaminado con petróleo crudo + 30 ml de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( $30 \times 10^4$ )	270 ml de caldo tripticasa de soya+ 50g de suelo contaminado con petróleo crudo + 30 ml de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( $30 \times 10^6$ )	270 ml de caldo tripticasa de soya+ 50g de suelo contaminado con petróleo crudo + 30 ml de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( $30 \times 10^8$ )
Blanco	300 ml de caldo tripticasa de soya+ 50g de suelo contaminado con petróleo crudo.		

Tabla 3: Tratamientos aplicados para la biodegradación de tolueno.

#### DISEÑO EXPERIMENTAL: Diseño Factorial 3 x 1 con 3 repeticiones.

Nº	Blanco	TRATAMIENTOS		
Día 7	R1	T1(r1, r2, r3)	T2(r1, r2, r3)	T3(r1, r2, r3)
Día 14	R1	T1(r1, r2, r3)	T2(r1, r2, r3)	T3(r1, r2, r3)
Día 21	R1	T1(r1, r2, r3)	T2(r1, r2, r3)	T3(r1, r2, r3)
Día 28	R1	T1(r1, r2, r3)	T2(r1, r2, r3)	T3(r1, r2, r3)

Tabla 4: N° de días para la toma de muestra por cada replica y tratamiento 1,2 y 3 de las diferentes concentraciones.

### 3.7 Cinética Microbiana

Para el cálculo de los rendimientos se realizaron mediante las siguientes formulas:

Yx/s: Coeficiente de rendimiento (g/g)

$$Y_{x/s} = \frac{\text{Biomasa Final} - \text{Biomasa Inicial}}{\text{Sustrato inicial} - \text{Sustrato final}}$$

Qx: Productividad Volumétrica de Biomasa (g/L.h)

$$Q_x = \frac{\text{Biomasa Final} - \text{Biomasa Inicial}}{\text{Tiempo}}$$

Qs: Productividad Volumétrica de Sustrato (g/L.h)

$$Q_s = \frac{\text{Sustrato final} - \text{Sustrato inicial}}{\text{Tiempo}}$$

### 3.6 ANALISIS ESTADISTICO

Para determinar la capacidad biodegradadora de tolueno usando *Pseudomona aeruginosa* en derrames de petróleo crudo, se utilizó ANOVA con un 95% de nivel de confiabilidad para determinar la relación entre la interacción entre las variables y su impacto en la variable dependiente: biodegradación de tolueno.

Se empleó el programa STATISTICA versión 10, lo cual permite diseñar el experimento, analizar los datos, entender y visualizar los resultados con facilidad.

## IV. RESULTADO Y DISCUSION

### Replica 1: ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

Concentración de <i>P. aeruginosa</i>	[Tolueno] g/L		
	7 días	14 días	28 días
[ ] de <i>P. aeruginosa</i> 30x10 <sup>4</sup> UFC/ml	0.8034767	0.8448817	0.7719244
[ ] de <i>P. aeruginosa</i> : 30x10 <sup>6</sup> UFC/ml	0.7815103	0.7308103	0.6801103
[ ] de <i>P. aeruginosa</i> : 30x10 <sup>8</sup> UFC/ml	0.60673028	0.56203992	0.49443992

Tabla 5: Resultados de la muestra de la primer replica.

Tabla 5 muestra las concentraciones de *P. aeruginosa* vs tiempo, resultado a los 7 días, 14 días y 28 días. En el día 7 la [ ] de *P. aeruginosa* 30x10<sup>4</sup> se observó una concentración de 0.8034767 g/L de Tolueno y a los 28 días 0.7719244 g/L.

Respecto a la [ ] de *P. aeruginosa*  $30 \times 10^6$  en el día 7 se obtuvo una concentración de Tolueno de 0.7815103 g/L y a los 28 días fue de 0.6801103 g/L.

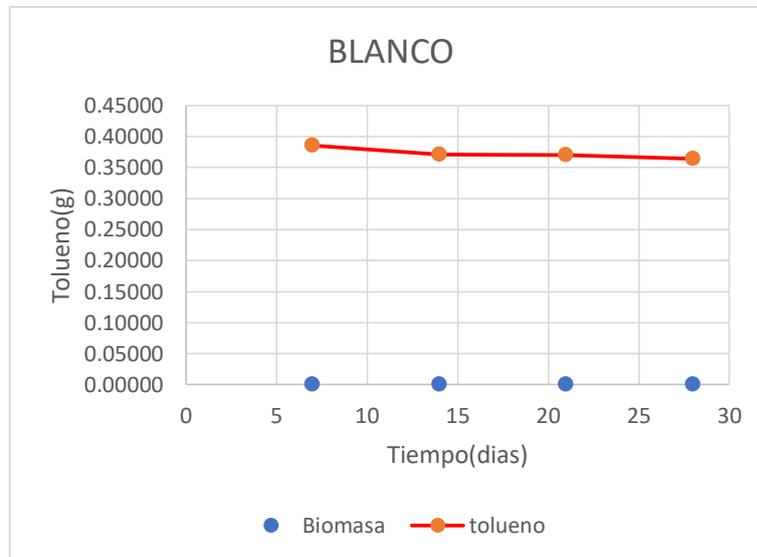
En la [ ] de *P. aeruginosa*  $30 \times 10^8$  a los 7 días de tratamiento obtuvimos una concentración de tolueno de 0.60673028 gr/L y a los 28 días, una concentración de 0.49443992 gr/L de Tolueno.

**REPLICA 2: Biodegradación de Tolueno**

Blanco		Matraz 1
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00000	0.3858572
14	0.00000	0.3710002
21	0.00000	0.3700000
28	0.00000	0.3644702

Tabla N°6. Peso en gramos de biomasa del diseño patrón vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Grafica 1. Peso en gramos de biomasa del diseño patrón vs sustrato.

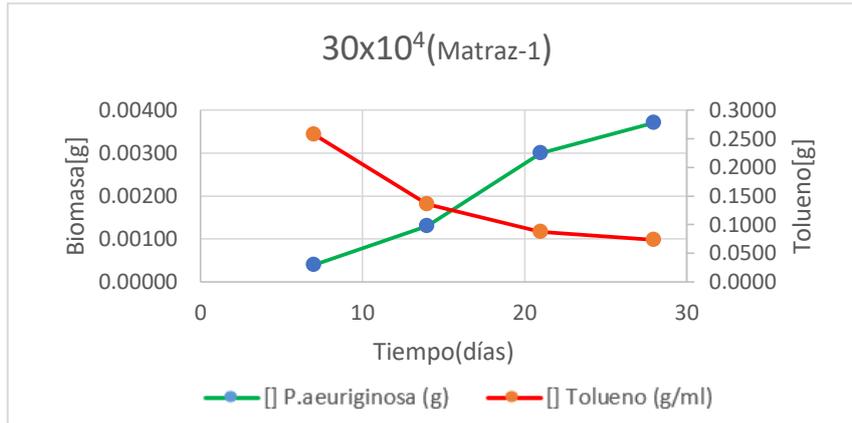
Fuente: Domínguez & Rosales 2022

En el grafico se observa el peso en gramos sustrato (Tolueno) una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo.

30x10 <sup>4</sup> UFC/ml		Matraz 1
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00040	0.2574
14	0.00130	0.1354
21	0.00300	0.0873
28	0.00370	0.0737

Tabla N°7. Matraz 1 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^4$  vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s(g/g)	Qx(g/L.d)	Qs(g/L.d)
0.04887	0.0001285	0.002630

Grafica 2. Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^4$  vs sustrato

Fuente: Domínguez & Rosales 2022

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^4$  hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo, el coeficiente de rendimiento se determinó mediante las siguientes formulas:

Yx/s: Coeficiente de rendimiento (g/g)

$$Y_{x/s} = \frac{\text{Biomasa Final} - \text{Biomasa Inicial}}{\text{Sustrato inicial} - \text{Sustrato final}}$$

$$Y_{x/s} = \frac{0.00370 - 0.00040}{0.2574 - 0.0737}$$

$$Y_{x/s} = 0.04887 \text{ g/g}$$

Qx: Productividad Volumétrica de Biomasa (g/L.h)

$$Q_x = \frac{\text{Biomasa Final} - \text{Biomasa Inicial}}{\text{Tiempo}}$$

$$Q_x = \frac{0.00370 - 0.00040}{28}$$

$$Q_x = 0.0001285 \text{ g/L.h}$$

Qs: Productividad Volumétrica de Sustrato (g/L.h)

$$Q_s = \frac{\text{Sustrato final} - \text{Sustrato inicial}}{\text{Tiempo}}$$

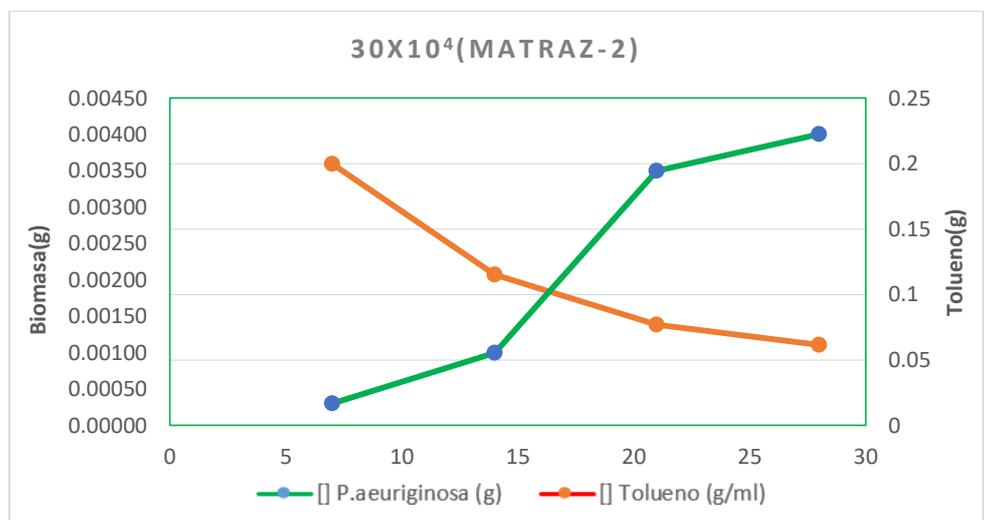
$$Q_s = \frac{0.0737 - 0.2574}{28}$$

$$Q_s = 0.002630 \text{ g/L.h}$$

30x10 <sup>4</sup> UFC/ml		Matraz 2
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00030	0.1995612
14	0.00100	0.1153167
21	0.00350	0.0767883
28	0.00400	0.0613791

Tabla N°8. Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>4</sup> vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s(g/g)	Qx(g/L.d)	Qs(g/L.d)
0.061910325	0.000135714	0.00219211

Grafica 3. Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>4</sup> vs sustrato

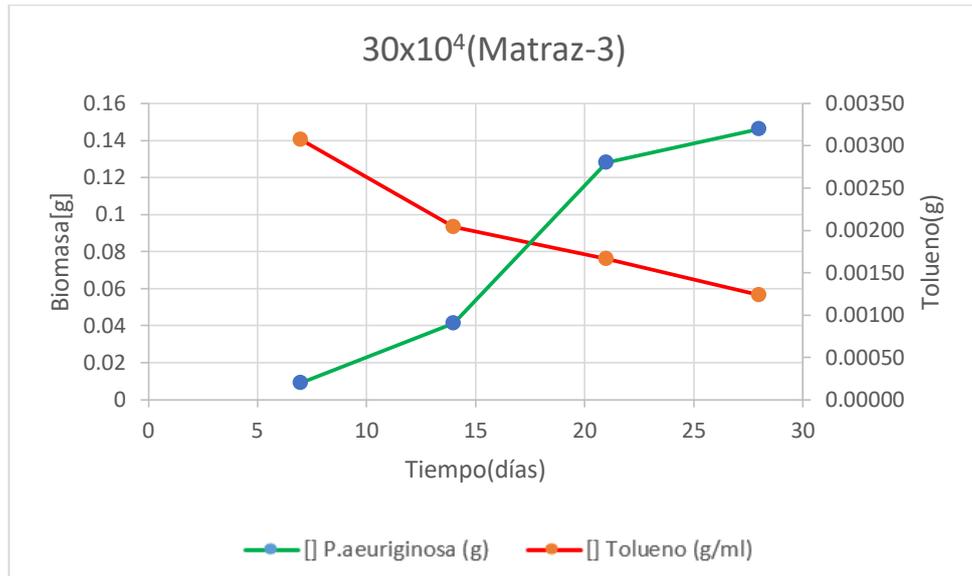
Fuente: Domínguez & Rosales 2022

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>4</sup> hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo.

30x10 <sup>4</sup> UFC/ml		Matraz 3
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00020	0.1405448
14	0.00090	0.0933704
21	0.00280	0.0761645
28	0.00320	0.0564028

Tabla N°9. Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>4</sup> vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s(g/g)	Qx(g/L.d)	Qs(g/L.d)
0.05496	0.0001107	0.002014

Grafica 4. Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^4$  vs sustrato

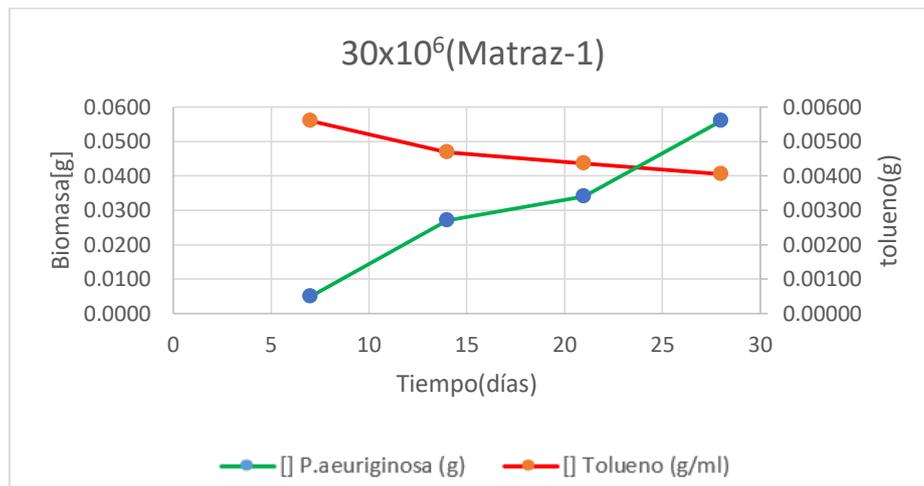
Fuente: Domínguez & Rosales 2022

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^4$  hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo

30x10 <sup>6</sup> UFC/ml		Matraz 1
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00050	0.0559
14	0.00270	0.0469
21	0.00340	0.0437
28	0.00560	0.0405

Tabla N°9. Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^6$  vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s(g/g)	Qx(g/L.d)	Qs(g/L.d)
0.1235	0.0001785	0.001445

Grafica 5. Matraz 1 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^6$  vs sustrato

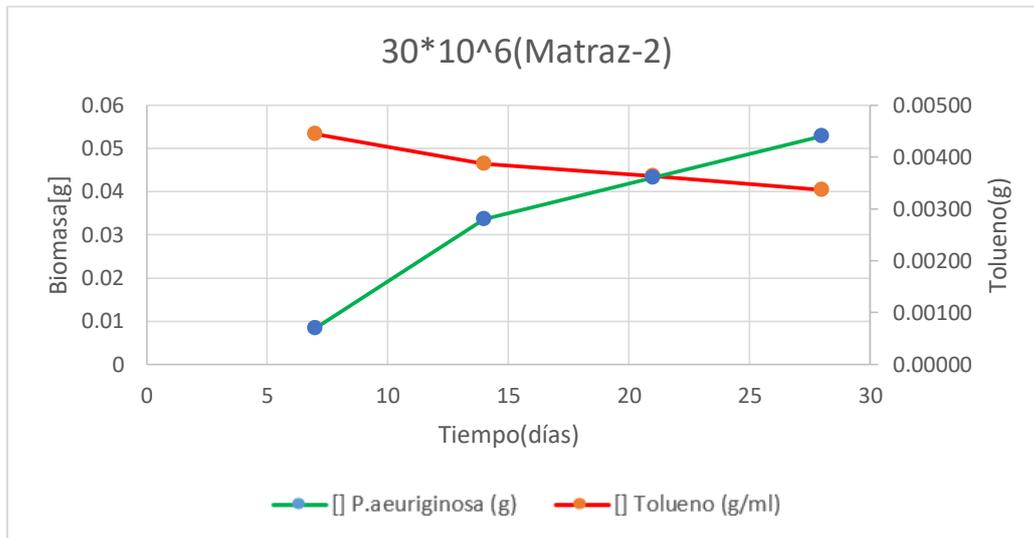
Fuente: Domínguez & Rosales 2022

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^6$  hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo

30x10 <sup>6</sup> UFC/ml		Matraz 2
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00070	0.0533751
14	0.00280	0.0464482
21	0.00360	0.0436198
28	0.00440	0.0404445

Tabla N°11. Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^6$  vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s(g/g)	Qx(g/L.d)	Qs(g/L.d)
0.09148	0.0001321	0.001444

Grafica 6. Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^6$  vs sustrato

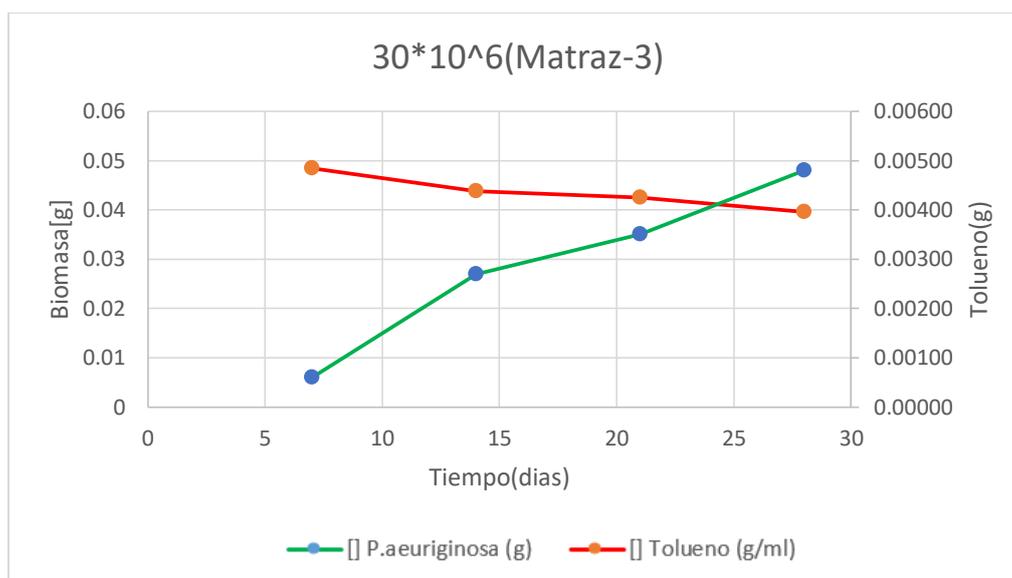
Fuente: Domínguez & Rosales 2022

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^6$  hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo.

30x10 <sup>6</sup> UFC/ml		Matraz 3
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00060	0.0484347
14	0.00270	0.043815
21	0.00350	0.042541
28	0.00480	0.0396346

Tabla N°12. Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>6</sup> vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s(g/g)	Qx(g/L.d)	Qs(g/L.d)
0.10596802	0.00015	0.00141552

Grafica 7. Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>6</sup> vs sustrato

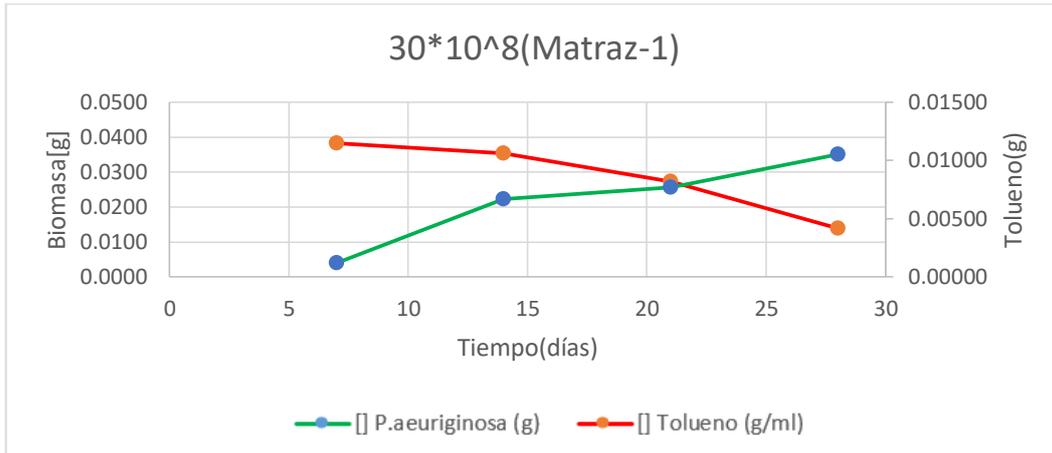
Fuente: Domínguez & Rosales 2022

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración **30x10<sup>6</sup>** hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo

30x10 <sup>8</sup> UFC/ml		Matraz 1
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00120	0.0383
14	0.00670	0.0354
21	0.00768	0.0273
28	0.01050	0.0139

Tabla N°13. Matraz 1 Peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>8</sup> vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s(g/g)	Qx(g/L.d)	Qs(g/L.d)
0.691587842	0.000342857	0.000495754

Grafica 8. Matraz 1 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^8$  vs sustrato

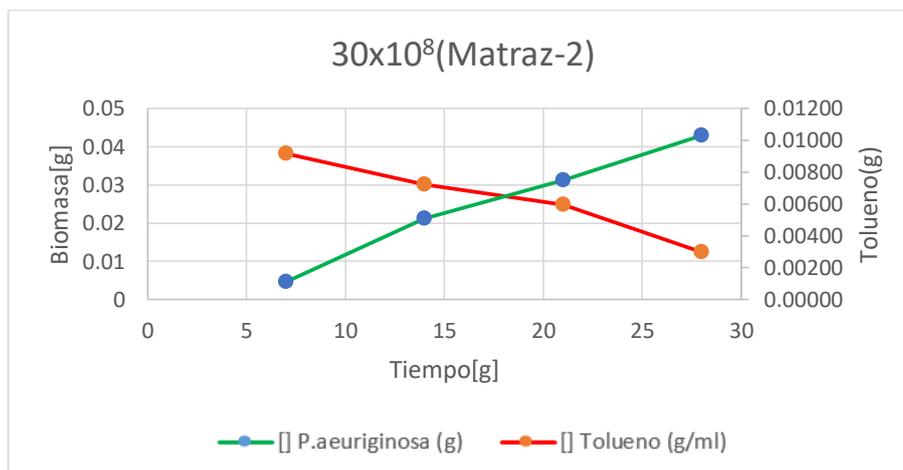
Fuente: Domínguez & Rosales 2022

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^8$  hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo.

30x10 <sup>8</sup> UFC/ml		Matraz 2
Tiempo	[] P. aeruginosa (g)	[] Tolueno (g/ml)
7	0.00110	0.0382205
14	0.00510	0.0301446
21	0.00750	0.024789
28	0.01030	0.0125002

Tabla N°14. Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^8$  vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s(g/g)	Qx(g/L.d)	Qs(g/L.d)
0.743988096	0.000332143	0.00044644

Grafica 9. Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^8$  vs sustrato

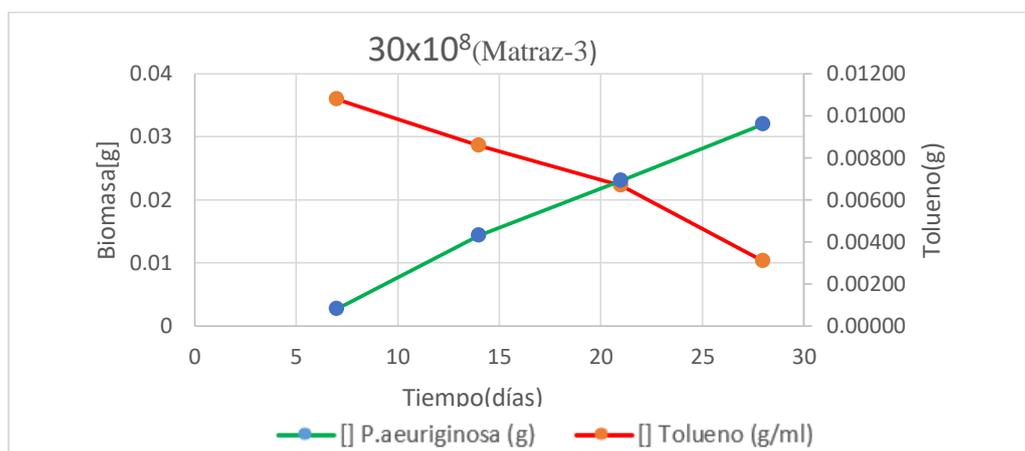
Fuente: Dominguez & Rosales 2022

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^8$  hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo

30x10 <sup>8</sup> UFC/ml		Matraz 3
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00080	0.0359638
14	0.00430	0.0285481
21	0.00690	0.022239
28	0.00960	0.0102985

Tabla N°15. Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^8$  vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s(g/g)	Qx(g/L.d)	Qs(g/L.d)
0.85449337	0.000314286	0.0003678

Grafica 10. Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^8$  vs sustrato

Fuente: Domínguez & Rosales 2022

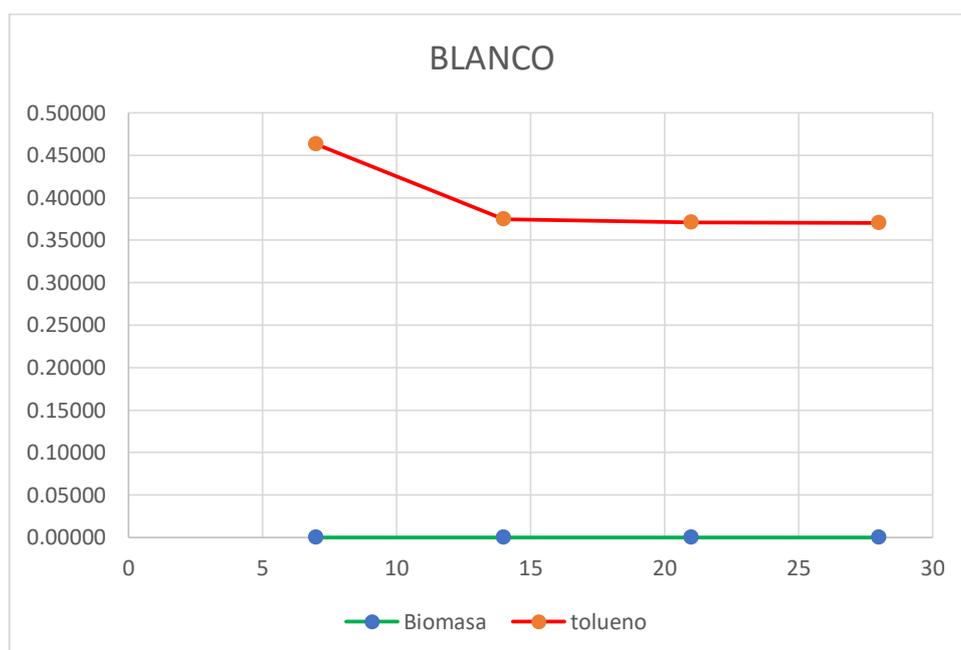
En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^8$  hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo

### REPLICA 3: Biodegradación de Tolueno

Blanco		Matraz 1
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00000	0.463144
14	0.00000	0.374606
21	0.00000	0.371000
28	0.00000	0.370000

Tabla N°17. Peso en gramos de biomasa del diseño patrón vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Gráfica 11. Replica 3 Peso en gramos de biomasa del diseño patrón vs sustrato.

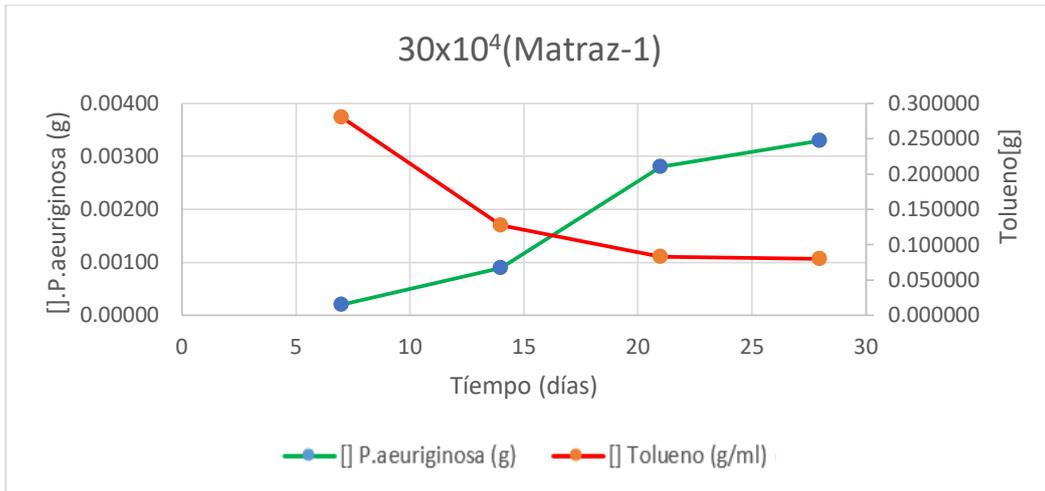
Fuente: Domínguez & Rosales 2022

En el gráfica 11 se observa el peso en gramos del sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo.

30x10 <sup>4</sup> UFC/ml		Matraz 1
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00020	0.280271
14	0.00090	0.127343
21	0.00280	0.082926
28	0.00330	0.080005

Tabla N°18. Peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>4</sup> vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Y <sub>x/s</sub>	Q <sub>x</sub>	Q <sub>s</sub>
0.00418303	0.0001143	0.0273213

Grafica 12. R3 Matraz 1 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^4$  vs sustrato

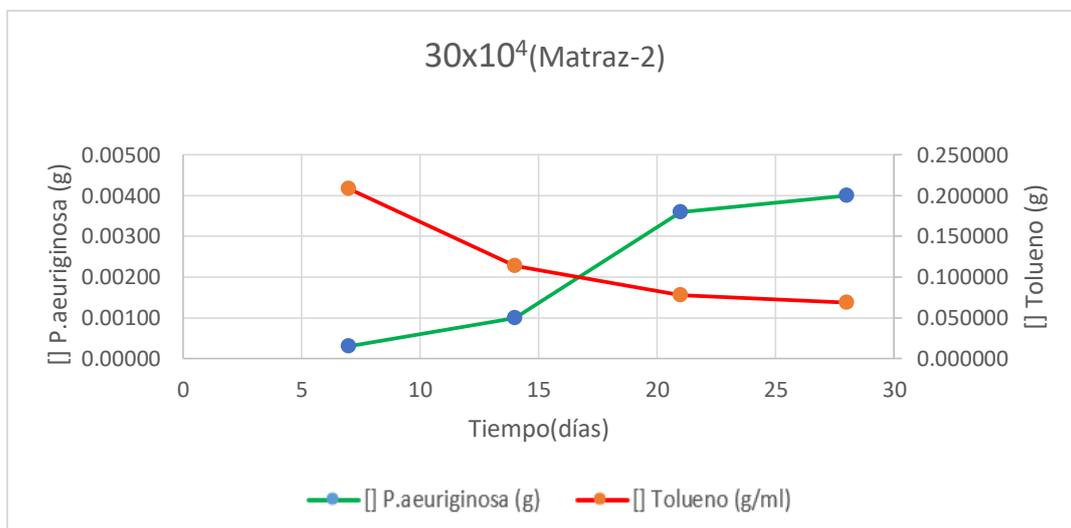
Fuente: Domínguez & Rosales 2022

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^4$  hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo

30x10 <sup>4</sup> UFC/ml		Matraz 2
Tiempo	[ ] P. aeruginosa (g)	[ ] Tolueno (g)
7	0.00030	0.208238
14	0.00100	0.113583
21	0.00360	0.077658
28	0.00400	0.068654

Tabla N°19. Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^4$  vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s	Qx	Qs
0.004894725	0.000135714	0.0277266

Grafica 13. R3 Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^4$  vs sustrato

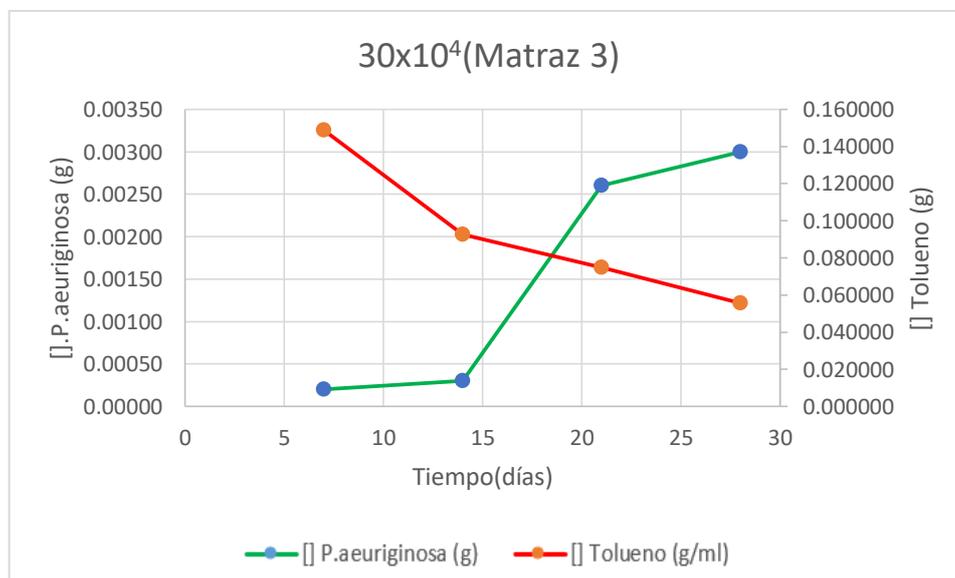
Fuente: Domínguez & Rosales 2022.

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^4$  hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo.

30x10 <sup>4</sup> UFC/ml		Matraz 3
Tiempo	[ ] P. aeruginosa (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00020	0.148931
14	0.00030	0.092503
21	0.00260	0.074717
28	0.00300	0.055535

Tabla N°20. Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^4$  vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s	Qx	Qs
0.00367337	0.00010357	0.02819518

Grafica 14. R3 Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^4$  vs sustrato

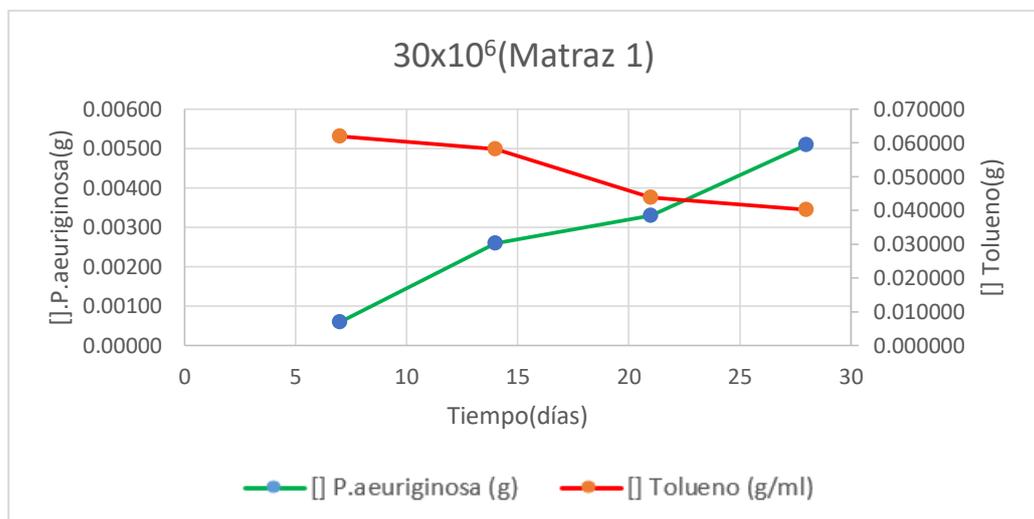
Fuente: Domínguez & Saul 2022

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^4$  hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo.

30x10 <sup>6</sup> UFC/ml		Matraz 1
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00060	0.061930
14	0.00260	0.058178
21	0.00330	0.043909
28	0.00510	0.040194

Tabla N° 21. Peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>6</sup> vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s	Qx	Qs
0.00559141	0.0001607	0.0287431

Grafica 15. R3 Matraz 1 Peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>6</sup> vs sustrato

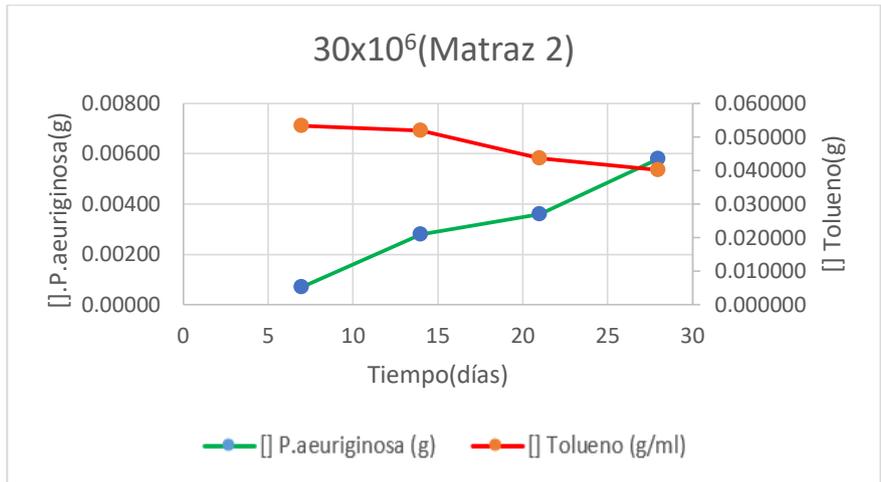
Fuente: Domínguez & Rosales 2022

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>6</sup> hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo.

30x10 <sup>6</sup> UFC/ml		Matraz 2
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00070	0.053375
14	0.00280	0.051930
21	0.00360	0.043652
28	0.00580	0.040156

Tabla N°22. Peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>6</sup> vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s	Qx	Qs
0.006336631	0.000182143	0.0287444

Grafica 16. R3 Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^6$  vs sustrato

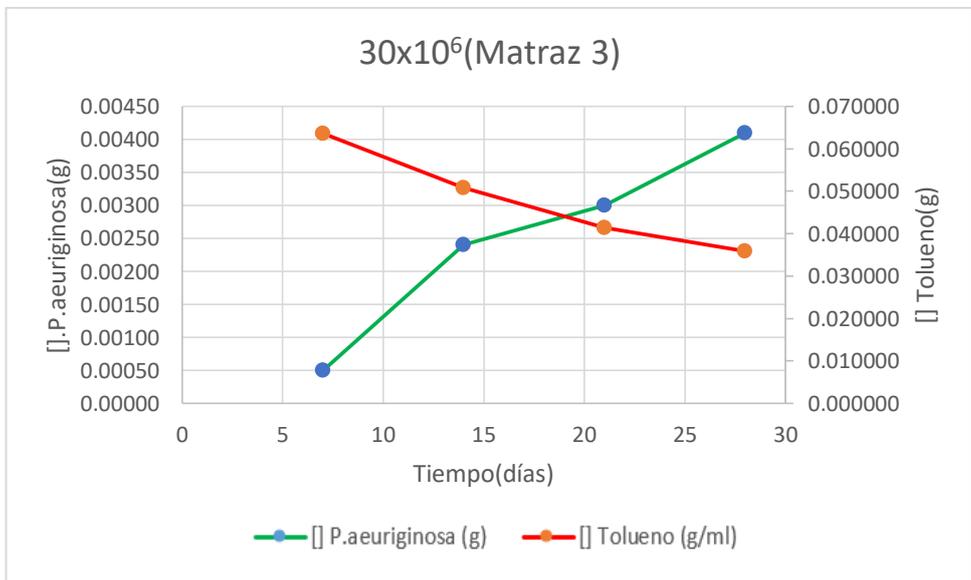
Fuente: Domínguez & Rosales 2022

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^6$  hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo.

30x10 <sup>6</sup> UFC/ml		Matraz 3
Tiempo	[ ] P. aeruginosa (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00050	0.063646
14	0.00240	0.050779
21	0.00300	0.041383
28	0.00410	0.035874

Tabla N°23. Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \times 10^6$  vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s	Qx	Qs
0.00432565	0.000125	0.02889737

Grafica 17. R3 Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^6$  vs sustrato

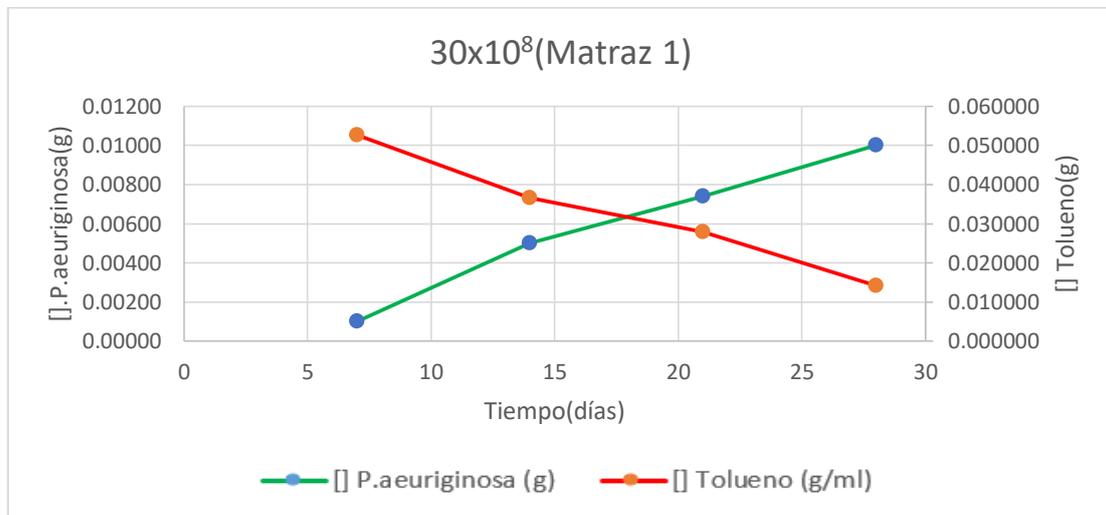
Fuente: Domínguez & Saul 2022

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^6$  hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo.

30x10 <sup>8</sup> UFC/ml		Matraz 1
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00100	0.052710
14	0.00500	0.036592
21	0.00740	0.027836
28	0.01000	0.014170

Tabla N°24. Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^8$  vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s	Qx	Qs
0.01095291	0.000325	0.0296725

Grafica 18. R3 Matraz 1 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^8$  VS sustrato

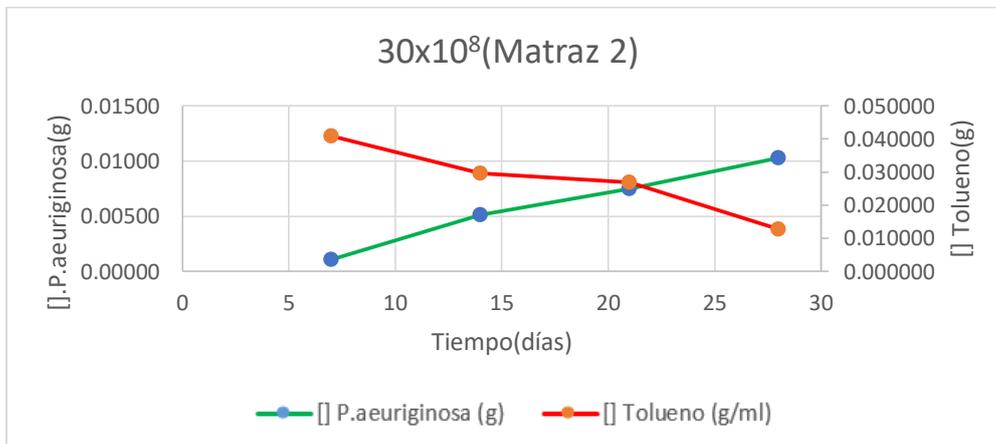
Fuente: Domínguez & Rosales 2022.

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^8$  hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo.

30x10 <sup>8</sup> UFC/ml		Matraz 2
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (gr)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00110	0.040826
14	0.00510	0.029592
21	0.00750	0.026807
28	0.01030	0.012791

Tabla N°25. Peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>8</sup> vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.



Yx/s	Qx	Qs
0.011175076	0.000332143	0.0297218

Grafica 19. R3 Matraz 2 Peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>8</sup> vs sustrato

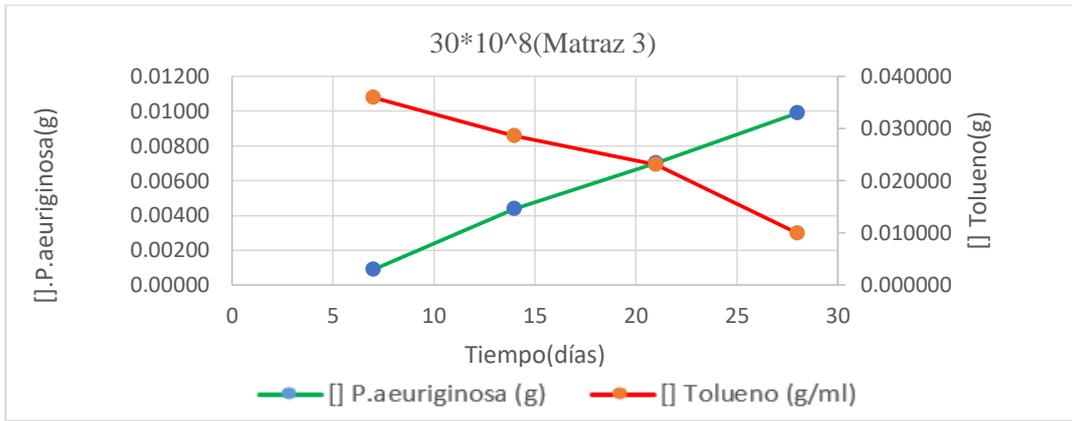
Fuente: Domínguez & Rosales 2022

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración **30\*10<sup>8</sup>** hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo.

30x10 <sup>8</sup> UFC/ml		Matraz 3
Tiempo	[ ] <i>P. aeruginosa</i> (g)	[ ] Tolueno (g/ml)
7	0.00090	0.035964
14	0.00440	0.028548
21	0.00700	0.023105
28	0.00990	0.009905

Tabla N°26. Peso en gramos de biomasa de la concentración 30\*10<sup>8</sup> vs sustrato

Fuente: Resultados de las muestras del laboratorio de la UNT.

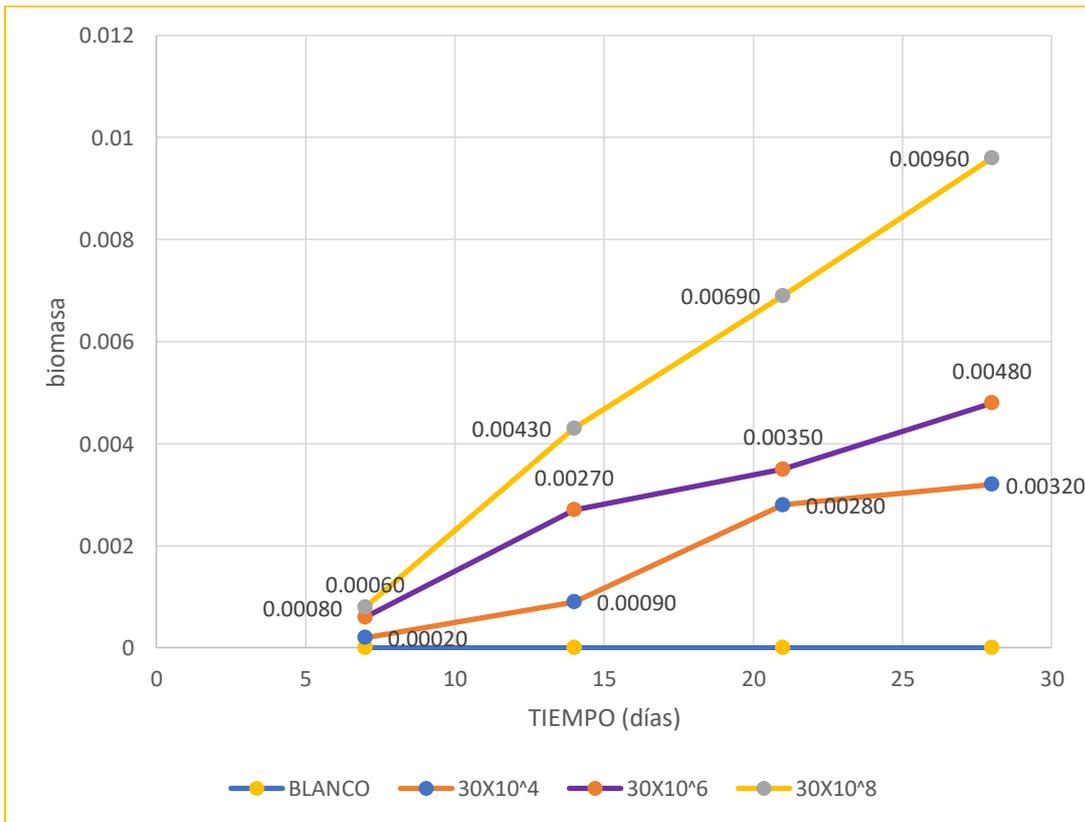


Yx/s	Qx	Qs
0.01089696	0.000325	0.02982483

Grafica 20. R3 Matraz 3 Peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^8$  vs sustrato

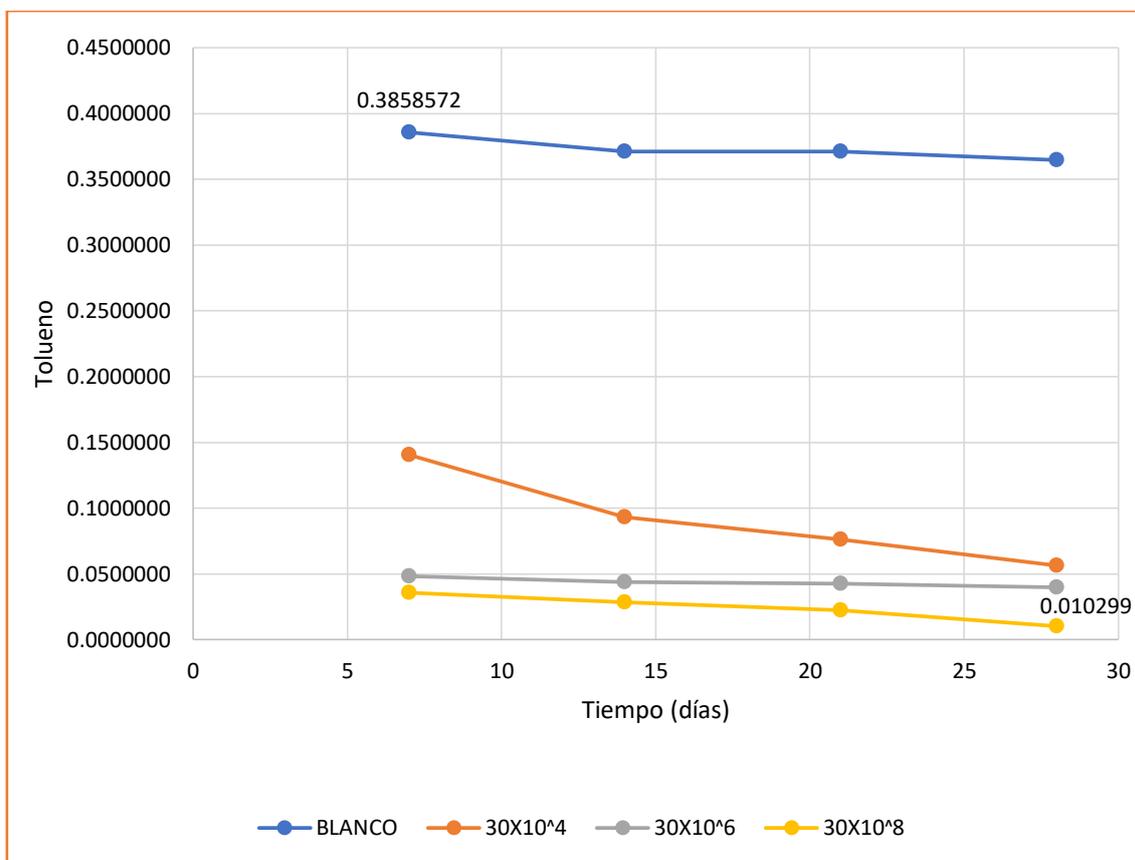
Fuente: Domínguez & Rosales 2022.

En el grafico se observa el peso en gramos de biomasa de la concentración  $30 \cdot 10^8$  hay aumento de la biomasa con respecto al tiempo en (días) y con respecto al sustrato (Tolueno) se observa una disminución de tolueno biodegradación con respecto al tiempo.



Grafica 21. El aumento de la biomasa de las diferentes concentraciones de *P. aeruginosa* durante los 28

días.



Grafica 22. La disminución de Tolueno durante los 28 días.

#### 4.1 DISCUSIÓN

Parales (2000). Evaluó la capacidad degradativa y reacción quimiotáctica de cinco cepas, determinando que *Pseudomonas aeruginosa*, degrada de manera eficaz los hidrocarburos. Efectivamente podemos confirmar que *P. aeruginosa* tiene la capacidad de biodegradar hidrocarburos en nuestro caso el Tolueno teniendo una efectividad del 98 %.

Se mostró la capacidad de *P. aeruginosa* para degradar compuestos aromáticos, y debido a esta característica metabólica la cepa creció en presencia de concentraciones elevadas de tolueno (0.31 M), benceno (0.19 M) y fenol (0.13 M), lo que permite su aplicación en procesos de biotecnología ambiental (Rangel & Hernández 2009).

Abalos A. y col. 2004. Estudiaron los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10, determinando que la adición de los mismos, acelera la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en un 61% en 10 días de incubación. Sin embargo, en nuestro proyecto de

investigación demostramos que *Pseudomonas aeruginosa* biodegrada Tolueno en un 50 % en 7 días.

En la mayoría de los trabajos de biorremediación es importante la producción de una buena cantidad de proteína celular (biomasa), el tipo de población bacteriana y sus actividades enzimáticas. Si no se produce suficiente biomasa de las bacterias degradadoras y la concentración de los contaminantes es muy alta, no se realizará una degradación rápida o eficiente (Norman et al, 2004).

A diferencia de los resultados obtenidos, Hernández et al. (2003) determinaron que las mayores poblaciones de bacterias se alcanzaron a los 20 días, tiempo al que también correspondió la mayor tasa de remoción de hidrocarburos totales de petróleo de un 50% de degradación. De igual manera Pardo et al. (2004) determinaron una asociación entre el aumento de la población microbiana y el mayor porcentaje de biodegradación de hidrocarburos de petróleo. Estos investigadores registraron a los 30 días 65% de degradación en comparación con 80 % a los 60 días y 95.3 % a los 90 días de iniciada la biorremediación.

Mendo (2014) realizó estudios de degradación de hidrocarburos en sedimentos contaminados con bacterias autóctonas *Ochrobactrum anthropi* y demostró una degradación de 68.36% para ello se realizó el aislamiento en agar medio Bushnell Hass y luego pasado a un caldo cultivo puro pruebas de actividad biológica y bioensayos el tratamiento se dio en 28 días a comparación del tratamiento sin bacterias se dio una degradación de 90 días. Con la finalidad de confirmar la capacidad de biodegradación de *Pseudomonas aeruginosa* realizamos cultivos sucesivos de prueba en medio HB (Bushnell Haas,1941) con 1% de Tolueno como única fuente de carbono obtenido resultados óptimos en la biodegradación de tolueno.

Escalante R. (2002). Desarrolló un estudio sobre la biodegradación del crudo de petróleo en 3 terrarios durante 90 días, se aislaron 129 cepas bacterianas de las que presentaron una mejor actividad biodegradativa las especies: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus sp.* y *Serratia rubidaea*, las mismas que conformaron el consorcio utilizado en ese experimento.

El análisis inicial del suelo permitió establecer las características más importantes del diseño experimental donde tendría lugar el proceso de biodegradación de los hidrocarburos presentes; revelando el valor de parámetros de interés para realizar el biotratamiento de los suelos contaminados con derrames de petróleo (hidrocarburos), como: su textura, el pH, la materia orgánica, la densidad de la población microbiana y su disposición de nutrientes (fósforo y nitrógeno). La naturaleza del suelo y la presencia de microorganismos en una densidad adecuada son determinantes para lograr la degradación de los contaminantes e influyen en la concentración residual de los mismos (Gómez & Gaviria 2009).

Los hidrocarburos cuantificados para obtener los hidrocarburos totales de petróleo, corresponden a la fracción media, debido a que el experimento no contó con un control rígido para los componentes volátiles. Así, quedaron por fuera del análisis una gran cantidad de compuestos como los hidrocarburos alifáticos livianos, los de estructuras ramificadas y cíclicas, entre otros. De esta manera se identificó y cuantificó 1 hidrocarburo aromático (Tolueno) con estructuras de carbono en un rango de C7, los primeros compuestos de cadenas más cortas son degradados más fácilmente por *Pseudomonas aeruginosa* (Dominguez & Rosales 2022).

La disminución de los Hidrocarburos en el control se atribuye a factores abióticos como: las transformaciones químicas por el aumento de temperatura, para limitar la actividad de las bacterias en el suelo el suelo tuvo un pretratamiento a 100 °C por 8 horas; para evitar la intervención de otros microorganismos en el proceso como los hongos, de los cuales no se realizó ningún tipo de control; la volatilidad de los compuestos analizados y el cambio de la estructura del suelo en este tratamiento (Dominguez & Rosales).

La concentración que demostró una mayor biodegradación de tolueno fue  $30 \times 10^8$  UFC/ml, el cual presentó un porcentaje de eliminación de Tolueno del 98 %. Utilizando 30ml de Inoculo de la concentración  $30 \times 10^8$  a una temperatura de 30°C y a 150 rpm, se han logrado eficiencias superiores con respecto a los demás tratamientos para la degradación de tolueno con *Pseudomonas aeruginosa*. La biodegradación de tolueno a los 7 días fue del 50 % presentando una alta eficiencia (Dominguez & Rosales).

Tanto para el tratamiento por atenuación natural como por bioestimulación la población microbiana decrece después de la semana 4. Este mismo comportamiento fue observado por Menendez et al., (2007) reportando una caída en el crecimiento microbiano después de los 30 días. De manera distinta en nuestros tratamientos inoculados de *Pseudomonas aeruginosa*, en las últimas semanas presentaba un comportamiento creciente en la población microbiana, demostrando una buena adaptación del inóculo y sugiriendo la extensión del proceso para lograr un mayor nivel de degradación (Dominguez & Rosales).

Además, contrario a la atenuación natural la bioestimulación y la bioaumentación mostraron una fase de iniciación, donde las bacterias se adaptaron al contaminante en 5 y 3 semanas; respectivamente. Esta diferencia se puede justificar por la presencia del *Pseudomonas sp.*, el cual pudo haber producido biosurfactantes logrando una mayor biodisponibilidad de los hidrocarburos hacia los microorganismos (Gómez & Gaviria 2009).

Las tasas de biodegradación (T.B.) obtenidas en los biorreactores de tanque agitado con biopelícula de *P. aeruginosa*, favorecen el proceso y contribuyen a la remoción de tolueno en períodos cortos. Algunas investigaciones sobre este género permiten confirmar la capacidad y el rol que desempeña *P. aeruginosa* en diferentes aplicaciones biotecnológicas y su gran facilidad para formar biopelículas permite proponer tecnologías más eficientes en procesos de biorremediación (Vargas & Ramírez).

La eficiencia de la biodegradación de Tolueno se determinó mediante la cinética microbiana experimental y directamente a través de la cuantificación del  $Y_x/s$ : Coeficiente de rendimiento (g/g),  $Q_x$ : Productividad volumétrica de biomasa(g/L.h) y  $Q_s$ : Productividad volumétrica sustrato (g/L.h). Teniendo como resultado que *Pseudomonas aeruginosa* tiene una buena capacidad biodegradadora de Tolueno, siendo la concentración  $30 \times 10^8$  UFC/ml la más efectiva durante los 28 días de tratamiento (Dominguez & Rosales 2022).

El diseño experimental empleado es similar al descrito por Mendoza & Guerrero (2017), para determinar la biodegradación de Tolueno en el suelo por *Pseudomonas aeruginosa*, mediante 3 tratamientos con diferentes concentraciones, se utilizó caldo tripticasa de soya medio de crecimiento eficiente en el cual los microorganismos

presentan un mayor desarrollo en biorreactores de tanque agitado (Dominguez & Rosales).

Según la inferencia estadística a través de un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, se puede ver que hay una capacidad de biodegradación de la *Pseudomonas aeruginosa*, debido a que el estadístico de prueba hallado por el software **STATISTICA** (Anexos tabla 16-17) es mayor que el punto crítico calculado en la tabla de Fisher con 95 % de confianza que es igual a 3.982, y que para el Tratamiento 1 ( $30 \times 10^4$  UFC/ml) es 5.255 quiere decir que hay una diferencia en la media de la biodegradación de tolueno con respecto a la muestra blanco, y también con respecto al Tratamiento 2 que fue de 75.071 ( $30 \times 10^6$  UFC/ml) al igual que el Tratamiento 3 ( $30 \times 10^8$  UFC/ml) calculado por el paquete estadístico dio un resultado de 16.918; con estos datos se puede inferir que la media de los tratamientos; y que la significancia de los tres tratamientos es menor que 0.05, podemos mencionar que no hay una diferencia significativa entre las medias de los diferentes tratamientos, es decir que podemos usar cualquier concentración de los diferentes tratamientos empleados para poder biodegradar tolueno (Dominguez & Rosales 2022).

El limitante de los procesos de biorremediación es la lenta degradación del contaminante, por lo tanto, el uso de biorreactores permite diversas ventajas como el incremento de la biomasa como podemos observar en la (Grafica 21) viabilidad y vitalidad de *Pseudomonas aeruginosa* mejorando la biodegradación de tolueno (Grafica 22). El uso de sistemas de biorreactores incrementa el potencial de biorremediación y la capacidad de tolerar mejor las concentraciones del contaminante (Dominguez & Rosales).

Desarrollamos un estudio de biodegradación de suelo contaminado por derrames de petróleo crudo, aislando un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* con la capacidad biodegradadora de tolueno y determinando que la concentración óptima a utilizar es la concentración  $30 \times 10^8$  UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa*, a los 28 días de tratamiento (Grafica 19), se obtiene una biodegradación de 0.83471 g de tolueno equivalente al 98% de la tasa de biodegradación. (Dominguez & Rosales).

Después del período de incubación se observó crecimiento microbiano en todos los

tratamientos como se observa en la Grafica 21. La biodegradación con *Pseudomonas aeruginosa* a la concentración  $30 \times 10^8$  UFC/ml fue mejor en la réplica 3 en la Tabla 26 muestra la degradación de tolueno a los 28 días de tratamiento llegando a una concentración final de 0.009g de Tolueno, donde se obtuvo la remoción más alta para ambos (Dominguez & Rosales).

## V. CONCLUSIONES

1. De acuerdo a los análisis realizados en HPLC se demostró que existe una biodegradación, la cual se inició a una concentración de Tolueno en el suelo de 0.845 g/ml por cada 50g de muestra de suelo contaminado con petróleo crudo y se obtuvo una concentración final de Tolueno de 0,009g/ml, teniendo una efectividad del 98 % de biodegradación, siendo la concentración  $30 \times 10^8$  UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa* el mejor tratamiento en un período de 28 días.
2. El aporte biológico de nuestra investigación fue lograr el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* con la capacidad biodegradadora de Tolueno.
3. Se determinó la capacidad biodegradadora de tolueno que posee *Pseudomonas aeruginosa* siendo la concentración  $30 \times 10^8$  UFC/ml la más efectiva luego de los 28 días de tratamiento.
4. De acuerdo a la cinética microbiana podemos inferir que *Pseudomonas aeruginosa* se adapta a la fuente de carbono (Tolueno), teniendo un crecimiento exponencial de biomasa, con respecto al sustrato tenemos una disminución durante los 28 días de tratamiento.
5. El aporte INGENIERIL de nuestra investigación es: A los 7 días del tratamiento de las concentraciones ( $30 \times 10^4$ ,  $30 \times 10^6$  y  $30 \times 10^8$ ) UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa* tenemos una biodegradación de Tolueno hasta el 50 %, con este dato podemos inferir si manipulamos más variables como pH, humedad, DBO y temperatura en solo 15 días tendremos una biodegradación del 99 %.

## 5.1. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar procesos de bioaumentación complementarios al uso de consorcios microbianos.
2. El uso del Caldo Tripticasa Soya, es de mucha importancia debido que es un medio de crecimiento eficiente en el cual los microorganismos presentan un mayor desarrollo.
3. Se debe probar la capacidad degradadora de *Pseudomona aeruginosa* con mayor concentración y a menor tiempo
4. Sería recomendado realizar cultivos sucesivos en medio HB (Bushnell Haas, 1941) con (1%) de Tolueno para poder mantener la presión de selección con respecto a la actividad metabólica deseada.
5. Para obtener una mayor biodegradación de tolueno, es recomendable realizar un pretratamiento del suelo, hacer que la mezcla sea homogénea, para evitar complicaciones al momento de la toma de muestra.
6. Con el fin de evitar la utilización de agentes de superficie sintéticos, se recomienda utilizar cepas que produzcan bioemulsificantes que faciliten el acceso a las moléculas hidrófobas y así su degradación.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y VIRTUALES

Alberto, G. L. (2016). Toxicología Ocupacional. Universidad Internacional SEK. Ecuador.

Ángeles, M. (2010). Hidrocarburo Aromático Tolueno. Enciclopedia De Salud Y Seguridad En El Trabajo. España

ARBELI, Z. (2009). Biodegradation Of Persistent Organic Pollutants (Pops): I The Case of Polychlorinated Biphenyls (PCB). Revistas.Unal.Edu.Co.

ATSDR. (2016). Toxfaqs™ - Tolueno (Toluene). Disease, Agency for Toxic Substances.

Carpio, J. G. (2007). Estudio De Evaluaciones Por Contaminación De Suelos En Lima: Universidad Nacional De Ingeniería.

Contreras, D. S. (2014). Proyecto De Titulo Presentado En Conformidad A Los Requisitos. Universidad Del Bio-Bio, 14.

Cuartas, D. C. (2012). Biorremediación Para La Degradación De Hidrocarburos Totales Presentes En Los Sedimentos De Una Estación De Servicio De Combustible. Colombia: Universidad Tecnológica De Pereira Facultad De Ciencias Ambientales Pereira.

Databio. (2016). *Pseudomonas Aeruginosa*. Instituto Nacional De Seguridad E Higiene En El Trabajo.

Disease, A. F. (2011). Toxfaq's For Toluene. Colombia. Environmental Health Criteria 52, Tolueno. (2003). International Programme on Chemical Safety, 8-78.

Farmacopea, D. E. (2008). INSTRUCCIONES DE USO –MEDIOS EN FRASCOS LISTOS PARA USAR. BD Diagnostic Systems, 2.

Gamazo, C., & Sanchez , S. (2013). Microbiología Basada En La Experimentacion. Elsevier España, Barcelona, España.: GEA Consultoria Editorial, S.L.

Gerard J. Tortora, B. R. (2007). Introducción A La Microbiología. Madrid,España: Editorial Medica Panamericana.S.A.

Haro, G., Cuauhtémoc, L., González Bonilla, C. R., Pérez, J., Arturo, & Borja Aburto, V. H. (2008). Tolueno. Revista Médica Del Instituto Mexicano Del, 643 Pg- 650 Pg.

Hilderbrando, B. (2012). Biorremediación De Suelos Contaminados Por. Universidad Nacional Mayor De San Marcos.Lima

King. (2013). BD Pseudosel Agar (Cetrimide Agar). Becton Dickinson, 1-2.

King, W. R. (2003). Bacteriological Analytical Manual De La FDA. BD Diagnostic Systems Europe, 2.

M.Adriana, M. (2011). Biorremediación De Suelo Contaminado Con Hidrocarburos Empleando. Mexico: IPN-CIIDIR.

M.Flores, M. V.-A. (2011). Impacto Del Petróleo Crudo En Suelo Sobre LA. Tropical And Subtropical Agroecosystems, 511.

Medical Management Guidelines (Mmgs). (2014, Octubre 21). Agency For Toxic Substances and Disease Registry, 2.

Medical Management Guildelines (Mmgs) For Toluene. (2014, Octubre 21). Agency For Toxic Substances and Disease Registry, 6.

Mendez, A. (2010, octubre 12). La Guia. Retrieved From <https://Quimica.Lagua2000.Com/Compuestos-Quimicos/Tolueno>

Mondragón, I. (2015, Agosto 22). SCRIBD. Retrieved From <https://Es.Scribd.Com/Doc/275555110/Tolueno>

Public Health Statement Toluene. (2015, January 21). Agency For Toxic Substances and Disease Registry, 1-9.

R.Raul. (20 De junio De 2012). Usos De Compuestos Químicos Organicos. Obtenido De Usos De Compuestos Químicos Organicos: <http://Compuestosorganicos203.Blogspot.Pe/>

Rc, R. (20 De junio De 2012). Usos De Compuestos Químicos Organicos. Obtenido De Usos De Compuestos Químicos Organicos: <http://Compuestosorganicos203.Blogspot.Pe/>

Ríos, H. B. (2012). Biorremediación De Suelos Contaminados Por. Lima: Universidad Nacional Mayor De San Marcos.

RIPPEN. (1989). Tolueno. Centre For Ecological Sciences | Iisc |, 3-4.

Rittmann, B. E., & Seagren , E. (1994). In Situ Bioremediation. 2 Ed. Noyes Publication, 255 P.

Rojas-Triviño, A. (2011). Conceptos Y Practica De Microbiologia General. Universidad Nacional De Colombia Sede Palmira, 47-48.

Soberón, G. (2014, septiembre 11). Biblioweb. Retrieved From <http://Www.Biblioweb.Tic.Unam.Mx/Libros/Microbios/Cap3/>

Ssecoconsulting. (2015, septiembre 22). Educación En Ingeniería Química. Retrieved From <https://Www.Ssecoconsulting.Com/Acerca-Del-Petroacuteteleo-Crudo-Loreto.Html>

Toluene Chemical Summary. (2003). Environmental Proteccion Agency.

Toluene Fact Sheet. (2003). Environmental Protection Agency (EPA).

Toxfaq's For Toluene. (2014). Agency For Toxic Substances and Disease Registry, 2.

Toxicological Profile for Toluene. (2014, October 21). Agency For Toxic Substances and Disease Registry, <https://www.atsdr.cdc.gov/mmg/mmg.asp?id=157&tid=29>. Retrieved From Toxicological Profile for Toluene.

Toxicological Profile for Toluene. (2015). Agency For Toxic Substances and Disease Registry, 11.

Toxicological Profile for Toluene. (2015, January 21). Agency For Toxic Substances and Disease Registry, 13.

Trabajo, I. N. (2007). Documentación Toxicológica Para El Establecimiento Del Límite De Exposición Profesional Del Tolueno. DLEP, 2.

USEPA, O. (2003). Environmental Fact Sheet: Analytical Métodos For Fuel. US EPA ARCHIVE DOCUMENT, EPA\_510\_F-03-.

V.Luna, M. Y. (2011). Impacto Del Petróleo Crudo En Suelo Sobre La Microbiota De Vida Libre Fijadora De Nitrógeno. Tropical And Subtropical Agroecosystems, 521.

Vázquez-Luna, F. H. (2011). Impacto Del Petróleo Crudo En Suelo Sobre La Microbiota De Vida Libre Fijadora De Nitrógeno. Tropical And Subtropical Agroecosystems, 511.

Wayens, C. B. (2004). Estudio Del Potencial De Degradación De Los Hidrocarburos Por *Acinetobacter Sp.* y *Pseudomonas Putida* Para Su Aplicación En La Biorremediación De Suelos Contaminados. Cartago.

Wikilibros. (2017, Agosto 29). Wikibooks. Retrieved From [https://es.wikibooks.org/wiki/Disolventes\\_En\\_La\\_Industria\\_Qu%C3%ADmica/Hidrocarburos\\_Arom%C3%A1ticos#/Media/File:Toluene-From-Xtal-3D-Balls.Png](https://es.wikibooks.org/wiki/Disolventes_En_La_Industria_Qu%C3%ADmica/Hidrocarburos_Arom%C3%A1ticos#/Media/File:Toluene-From-Xtal-3D-Balls.Png)

Young, L. Y., & Cerniglia, C. E. (1995). Chemical Contamination of The Environment: Sources, Types, And. In Microbial Transformations and Degradation of Toxic Organic Chemicals (Vol. 1 St Edition, Pp. 27-74). New York: Wiley-Liss;

## VII. ANEXOS

### 7.1 Recolección del suelo contaminado



Figura 7: Ubicación de la refinería Petro Perú. Fuente Google maps. -3.631973,-73.203421.



Figura 8: Muestra del suelo contaminado extraído de los alrededores de la Refinería Petro Perú

### 7.2 Aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*



Figura 9: Proceso de aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*

### 7.3 Preparación del medio Agar Cetrimide

REACTIVO	C.B.P 70 ml
Cetrimida	3.29 g/L
Glicerol	0.7ml
Agua Destilada	70ml
Fenazopiridina	0.0015ml

Tabla1: Composición del Medio Agar Cetrimide.



Figura 10: Plaqueado en el medio agar Cetrimide.

### 7.4 Cultivo de *Pseudomonas Aeruginosa* en medio Agar Cetrimide

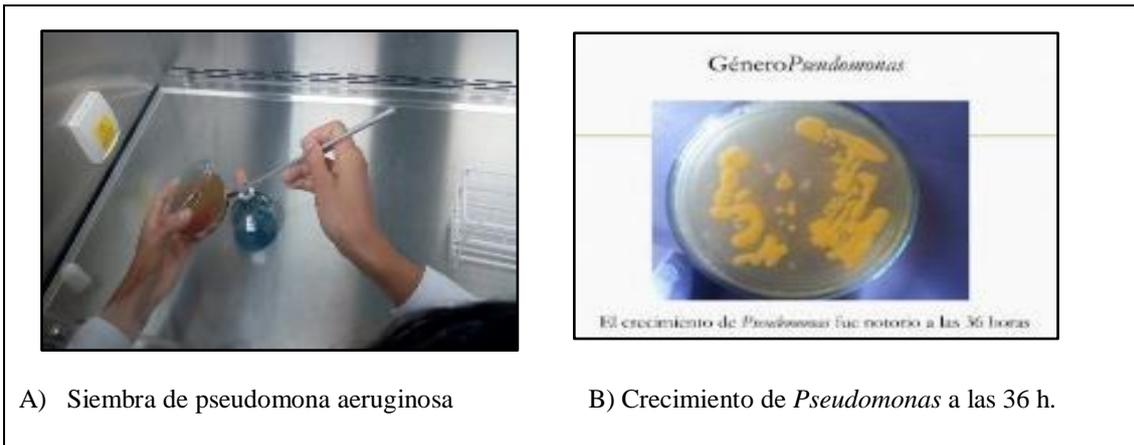


Figura 11: Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*.

## 7.5 Preparación del medio de mantenimiento y siembra.



Figura 12: Plaqueado y siembra de *P. aeruginosa*.

## 7.6 Identificación microscópica de *Pseudomonas aeruginosa* -Tinción Gram

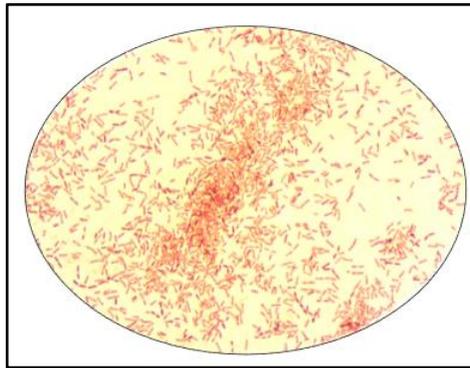


Figura 13: Tinción gram de *Pseudomonas aeruginosa*.

## 7.7 Establecimiento de la concentración inicial del inóculo

Diluciones para determinar las concentraciones de *Pseudomonas aeruginosa* ( $30 \times 10^4$ ,  $30 \times 10^6$  y  $30 \times 10^8$ ) usando los estándares de (Macfarlán).



Figura 14: Comparamos el tubo N°6 ( $18 \times 10^8$ )

ESCALA MCFARLAND				
Nº	BaCl <sub>2</sub> 0,048M ml	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,36M ml	Vf ml	Nº Células
0,5	0,05	9,95	10	1,5 · 10 <sup>8</sup>
1	0,1	9,9	10	3 · 10 <sup>8</sup>
2	0,2	9,8	10	6 · 10 <sup>8</sup>
3	0,3	9,7	10	9 · 10 <sup>8</sup>
4	0,4	9,6	10	12 · 10 <sup>8</sup>
5	0,5	9,5	10	15 · 10 <sup>8</sup>
6	0,6	9,4	10	18 · 10 <sup>8</sup>
7	0,7	9,3	10	21 · 10 <sup>8</sup>
8	0,8	9,2	10	24 · 10 <sup>8</sup>
9	0,9	9,1	10	27 · 10 <sup>8</sup>
10	1	9	10	30 · 10 <sup>8</sup>

Tabla 2: Escala McFarland

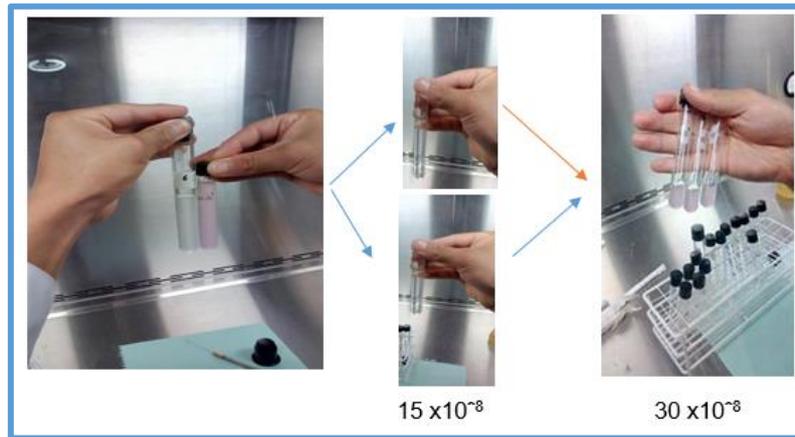


Figura 15: Dilución (1/5) 5ml de inoculo y 1ml de agua

**Dilución 30x10<sup>8</sup>:** Se toma 5 ml de inoculo del Tubo N° 6 (18x10<sup>8</sup>), y agregamos 1ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo estéril, obteniendo una concentración de 15x10<sup>8</sup>, este proceso se realiza 2 veces para obtener 2 tubos de ensayo con la solución 15x10<sup>8</sup>, posteriormente se unen las 2 diluciones de 15x10<sup>8</sup> formando 30x10<sup>8</sup> UFC/ml.

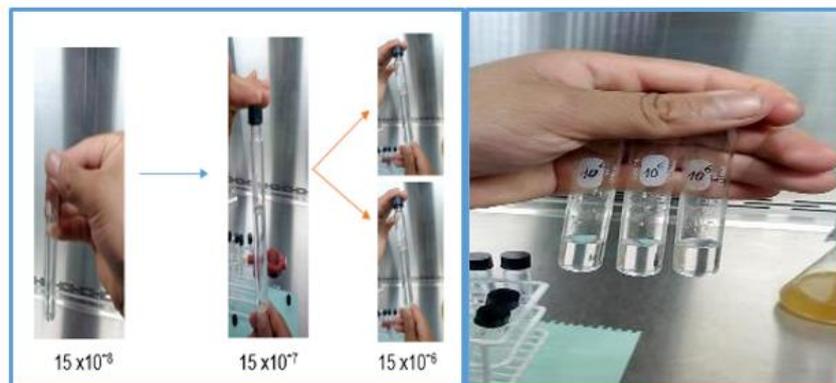


Figura 16: Dilución (1/9) 1ml de inoculo y 9ml de agua

**Dilución 30x10<sup>6</sup>:** Se toma 1 ml de inoculo de la concentración (15x10<sup>8</sup>), y agregamos 9 ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo estéril, obteniendo una concentración de 15x10<sup>7</sup>, en 2 tubos de ensayo agregamos 1 ml de inoculo de la concentración (15x10<sup>7</sup>), y agregamos 9 ml de agua destilada estéril obteniendo la concentración 30x10<sup>6</sup> UFC/ml

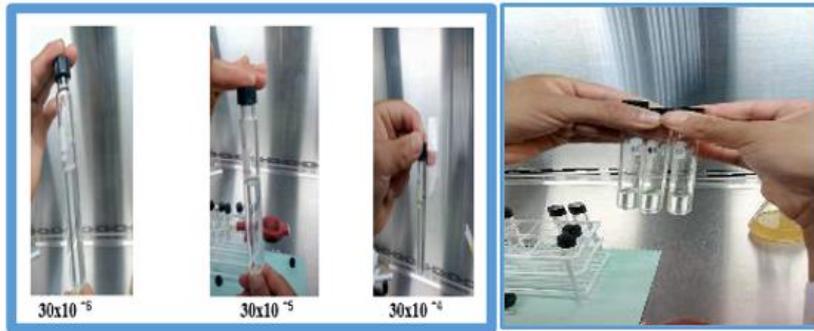


Figura 17: Dilución (1/9) 1ml de inoculo y 9ml de agua.

**Dilución  $30 \times 10^4$ :** Se toma 1 ml de inoculo de la concentración ( $30 \times 10^6$ ), y agregamos 9 ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo estéril, obteniendo una concentración de  $30 \times 10^5$ , otra vez agregamos 1 ml de inoculo de la concentración ( $30 \times 10^5$ ), y agregamos 9 ml de agua destilada estéril obteniendo la concentración  $30 \times 10^4$  UFC/ml.

### 7.8 Preparación del inoculo 28ml de caldo nutritivo y 2 mil de concentraciones de *Pseudomona aeruginosa* ( $30 \times 10^4$ , $30 \times 10^6$ y $30 \times 10^8$ ) UFC/ml.



Figura 18: Preparación del Inoculo de las diferentes concentraciones.

## 7.9 Pretratamiento del suelo contaminado con Petróleo.



Figura 19: Pretratamiento del suelo.

## 7.10 reparación de los tratamientos en Matraz Erlenmeyer de 500 ml

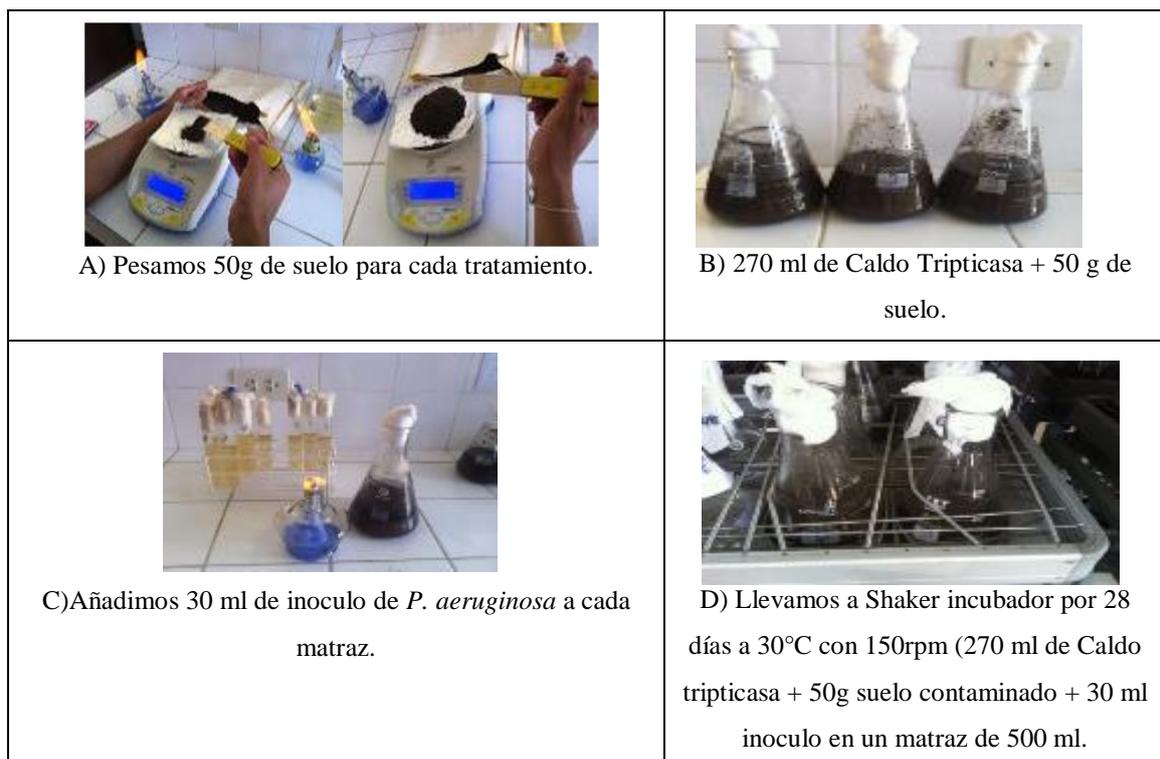


Figura 20: Preparación de los tratamientos e inoculación de *Pseudomonas aeruginosa*.

**7.11 Toma de Muestra de los Tratamientos y de cada replica a los días 7, 14, 21 y 28.**

 <p>A) Se toma 5 ml de muestra de los tratamientos <math>30 \times 10^4</math>, <math>30 \times 10^6</math> y <math>30 \times 10^8</math>.</p>	 <p>B) Llevamos a <math>100\text{ }^\circ\text{C}</math> por 5 min la muestra de los tratamientos para realizarle un shock térmico.</p>
 <p>C) Luego se lleva a <math>4\text{ }^\circ\text{C}</math> por 5 min.</p>	 <p>D) Las muestras tomadas de cada tratamiento fueron tapadas y aseguradas para su análisis por HPLC.</p>

*Figura 21: Toma de muestras de los tratamientos.*

**7.12 Determinación de Peso seco**

 <p>A) Muestras de los tratamientos <math>30 \times 10^4</math>, <math>30 \times 10^6</math> y <math>30 \times 10^8</math> y muestra control.</p>	 <p>B) Filtrado y centrifugado de las muestras de los diferentes tratamientos.</p>
 <p>C) Verter las muestras en los capachos de papel aluminio.</p>	 <p>D) Se llevo a <math>110\text{ }^\circ\text{C}</math> por 8 horas</p>
 <p>E) Se coloco en la campana de desecación por 8 horas y se realizó el pesado de los capachos.</p>	

*Figura 22: Determinación de Peso Seco de Pseudomonas aeruginosa*

**RESULTADOS:**

**REPLICA 1: ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR**

Si valor  $P < \alpha$  rechaza  $H_0$

Si valor  $P > \alpha$  acepto  $H_0$

	A1	A2	A3
[tolueno] g/L	0.8034767	0.7815103	0.60673028
	0.8448817	0.7308103	0.56203992
	0.7719244	0.6801103	0.49443992

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	2.4202828	0.806760933	0.00134
Columna 2	3	2.1924309	0.7308103	0.00257
Columna 3	3	1.66321012	0.554403373	0.0032

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.100572241	2	0.05028612	21.2318	0.001897601	5.14325285
Dentro de los grupos	0.014210581	6	0.00236843			
Total	0.114782821	8				

A una concentración de ( $10^4, 10^6$  y  $10^8$ ) de *Pseudomonas aeruginosa* la biodegradación de Tolueno será mayor con respecto al tiempo y mayor a la concentración del  $10^8$ .

## REPLICA 2: ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

### ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

Si valor  $P < \alpha$  rechaza  $H_0$

Si valor  $P > \alpha$  acepto  $H_0$

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Tratamiento 1	1,396 <sup>a</sup>	11	,127	5,255	,038
Tratamiento 2	1,813	1	1,813	75,071	,027
Tratamiento 3	1,226	3	,409	16,918	,021
Replicas	,045	3	,022	,928	,045
Tratamiento *	,126	6	,021	,866	,052
Replicas					
Error	,870	36	,024		
Total	4,079	48			
Total corregido	2,266	47			

Tabla 16. Replica 3 Peso en gramos de biomasa del diseño patrón vs sustrato

Fuente: Universidad Nacional de Trujillo- laboratorio de la escuela de ingeniería ambiental

En la tabla N°16 se puede visualizar que para la biodegradación de Tolueno, en el tratamiento 1, el  $p\text{-value} < \alpha$  ( $p=0.038$ ,  $p < 0.05$ ), también se tiene que para el tratamiento 2 el  $p\text{-value} < \alpha$  ( $p=0.027$ ,  $p < 0.05$ ) y para el tratamiento 3 el  $p\text{-value} < \alpha$  ( $p=0.021$ ,  $p < 0.05$ ), entonces podemos decir que los datos muestran suficientes evidencias para rechazar la hipótesis nula, aceptando la hipótesis alterna, podemos decir que existe evidencias suficientes para indicar que presenta biodegradación de Tolueno.

### REPLICA 3: ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

Si valor  $P < \alpha$  rechaza  $H_0$

Si valor  $P > \alpha$  acepto  $H_0$

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Tratamiento 1	1,396 <sup>a</sup>	11	,127	5,255	,041
Tratamiento 2	1,813	1	1,813	75,071	,037
Tratamiento 3	1,226	3	,409	16,918	,024
Replicas	,045	3	,022	,928	,045
Tratamiento * Replicas	,126	6	,021	,866	,052
Error	,870	36	,024		
Total	4,079	48			
Total corregido	2,266	47			

Tabla N°27: Biodegradación de Tolueno en los tratamientos 1,2 y 3.

Fuente: Universidad Nacional de Trujillo- laboratorio de la escuela de ingeniería ambiental

En la tabla N°27 se puede visualizar que para la biodegradación de Tolueno, en el tratamiento 1, el p-value  $< \alpha$  ( $p=0.041$ ,  $p < 0.05$ ), también se tiene que para el tratamiento 2 el p-value  $< \alpha$  ( $p=0.037$ ,  $p < 0.05$ ) y para el tratamiento 3 el p-value  $< \alpha$  ( $p=0.024$ ,  $p < 0.05$ ).

Según la inferencia estadística a través de un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, se puede ver que hay una capacidad de biodegradación de la *pseudomona aeruginosa*, debido a que el estadístico de prueba hallado por el software STATISTICA es mayor que el punto crítico calculado en la tabla de Fisher con 95 % de confianza que es igual a 3.982.

## RESULTADOS

ANÁLISIS SOLICITADO : ANÁLISIS DE TOLUENO  
 CONDICIONES AMBIENTALES : Temperatura: 20.0 °C; Humedad relativa: 65%  
 EQUIPO UTILIZADO : CROMATÓGRAFO DE GASES. SHIMADZU, GC-2010 Plus

ANÁLISIS	RESULTADO	METODO DE REFERENCIA
Tolueno, %	90	USP 40

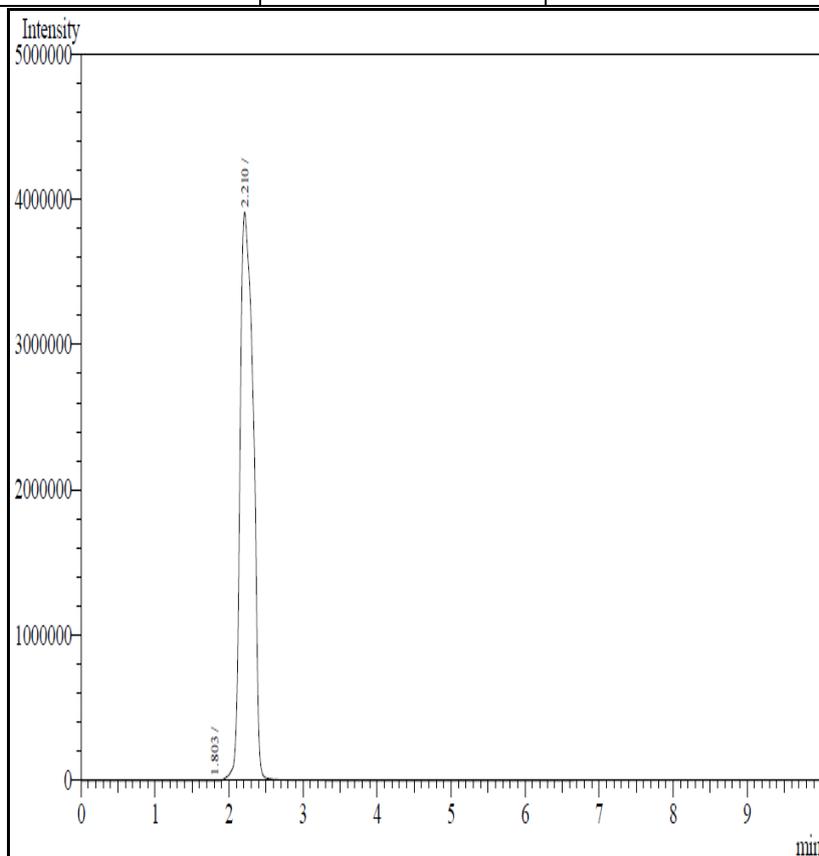


Figura N°1: Cromatograma De La Muestra Blanco

Peak#	Ret.Time	Área	[gr] Tolueno
1	1.803	0	n. a
2	2.210	0	n. a
3	2.311	3.07463	0.89
Total		3.07463	0.89

TABLA N°1: DATOS DEL CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA (CONTROL)

Peak#	Ret.Time	Área	[gr] Tolueno
1	1.797	0	n. a
2	1.941	0	n. a
3	2.287	0.223445656	0.7719244
Total		0.223445656	0.7719244

TABLA N°2: DATOS DEL CROMATOGRAMA DE  $30 \times 10^4$  De *Pseudomonas Aeruginosa*

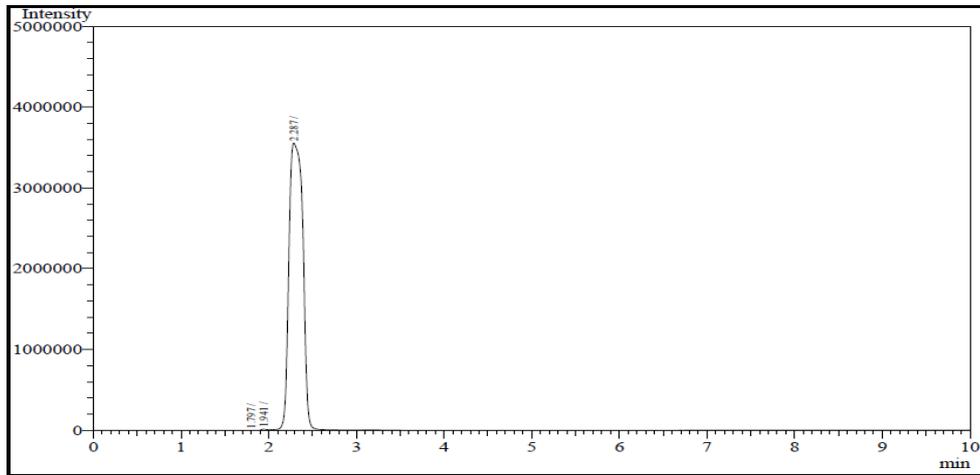


Figura N°2: Cromatograma De La Muestra de  $30 \times 10^4$  de *Pseudomonas Aeruginosa*

Peak#	Ret.Time	Área	[gr] Tolueno
1	1.774	0	n. a
2	2.178	0	0.6801103
Total		0.196868621	0.6801103

TABLA N°3: DATOS DEL CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR DE  $30 \times 10^6$  de *Pseudomonas aeruginosa*.

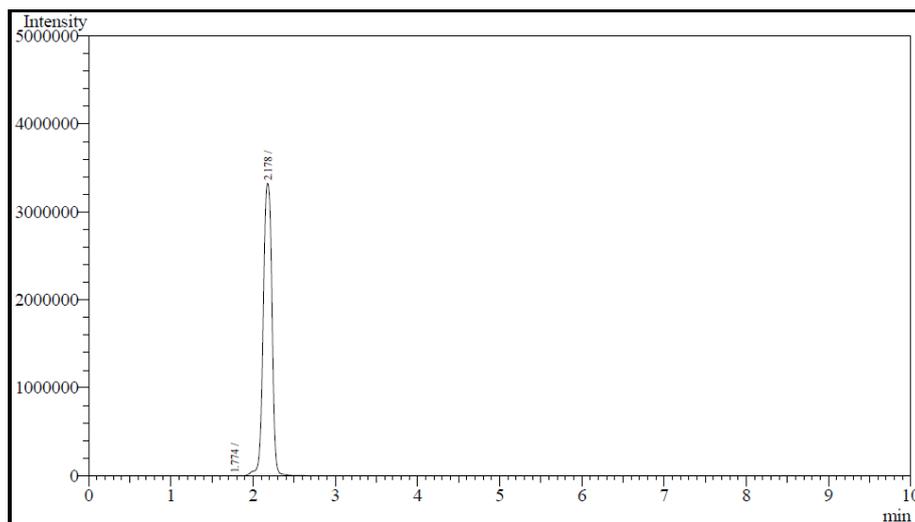


FIGURA N°3: CROMATOGRÁMA DEL ESTÁNDAR DE  $30 \times 10^6$  De *Pseudomonas Aeruginosa*.

Peak#	Ret.Time	Área	[gr] Tolueno
1	1.777	0	n. a
2	2.141	0	n. a
3	2.498	0.56203992	0.162691293
Total		0.56203992	0.162691293

TABLA N°4: CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR DE  $30 \times 10^8$  De *Pseudomonas Aeruginosa* (14días)

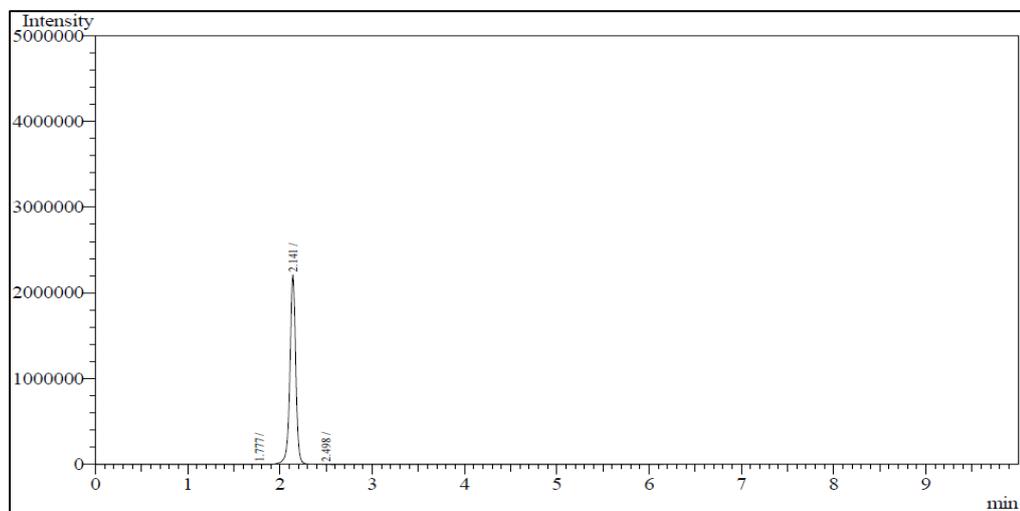


FIGURA N°4: CROMATOGRAMA DE LA CONCENTRACION  $30 \times 10^8$  (14días)

Peak#	Ret.Time	Área	[gr] Tolueno
1	1.777	0	n. a
2	2.141	0	n. a
3	2.498	0.14312341	0.49443992
Total		0.14312341	0.49443992

TABLA N°5: CROMATOGRAMA DE LA CONCENTRACION  $10^8$  al los 28 días.

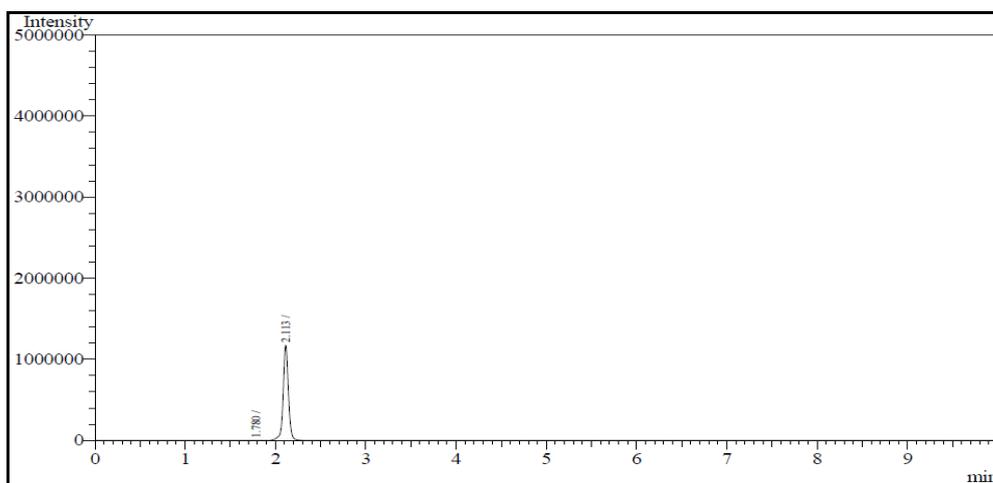


FIGURA N°5: CROMATOGRAMA DE LA CONCENTRACION,  $30 \times 10^8$  al los 28 días.

## SEGUNDA REPLICAS

### Determinación de Peso seco de las muestras para evaluar el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* a los 7 días.

Replica	[ ] de <i>P.aeruginosa</i>	Peso de capacho(inicial)	Peso de capacho(final)	Peso Neto
Matraz 1	10 <sup>8</sup>	0.124800	0.126000	0.001200
Matraz 2	10 <sup>8</sup>	0.128100	0.129200	0.001100
Matraz 3	10 <sup>8</sup>	0.128500	0.129300	0.000800
Matraz 1	10 <sup>6</sup>	0.153300	0.153800	0.000500
Matraz 2	10 <sup>6</sup>	0.149800	0.150500	0.000700
Matraz 3	10 <sup>6</sup>	0.135800	0.136400	0.000600
Matraz 1	10 <sup>4</sup>	0.144700	0.145100	0.000400
Matraz 2	10 <sup>4</sup>	0.150700	0.151000	0.000300
Matraz 3	10 <sup>4</sup>	0.138100	0.138300	0.000200
Control	Blanco	0.149300	0.149400	0.000100

**Tabla 2.-** Se puede observar en la primera columna el número de réplicas en la segunda columna muestra las concentraciones de *Pseudomonas aeruginosa*, en la tercera columna indica el peso del capacho inicial en (gr) en la cuarta columna muestra el peso del capacho final en (gr) luego de haber agregado las muestras de *Pseudomonas aeruginosa*, en la última columna se observa el peso neto de *P. aeruginosa* presente en cada concentración respecto a la réplica.

#### Resumen del Peso Seco de las muestras a los 7 días.

10 <sup>8</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.001200	0.001100	0.000800

10 <sup>6</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.000500	0.000700	0.000600

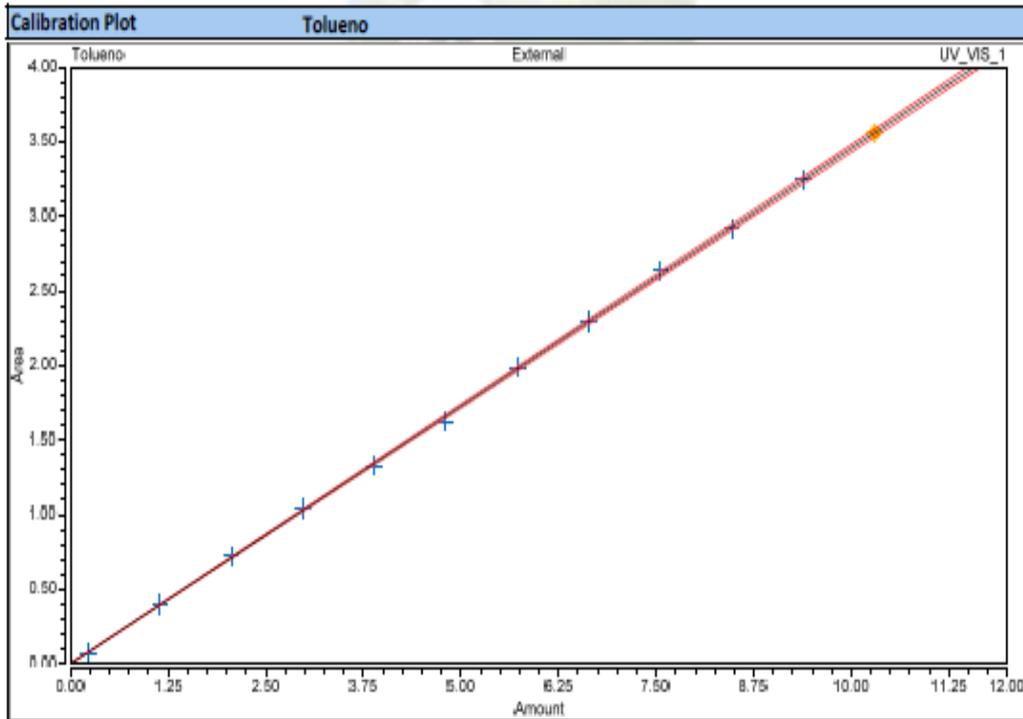
10 <sup>4</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.000400	0.000300	0.000200

Control	Matraz 1
	0.000000

#### Resumen del Peso Seco de las muestras a los 7 días.

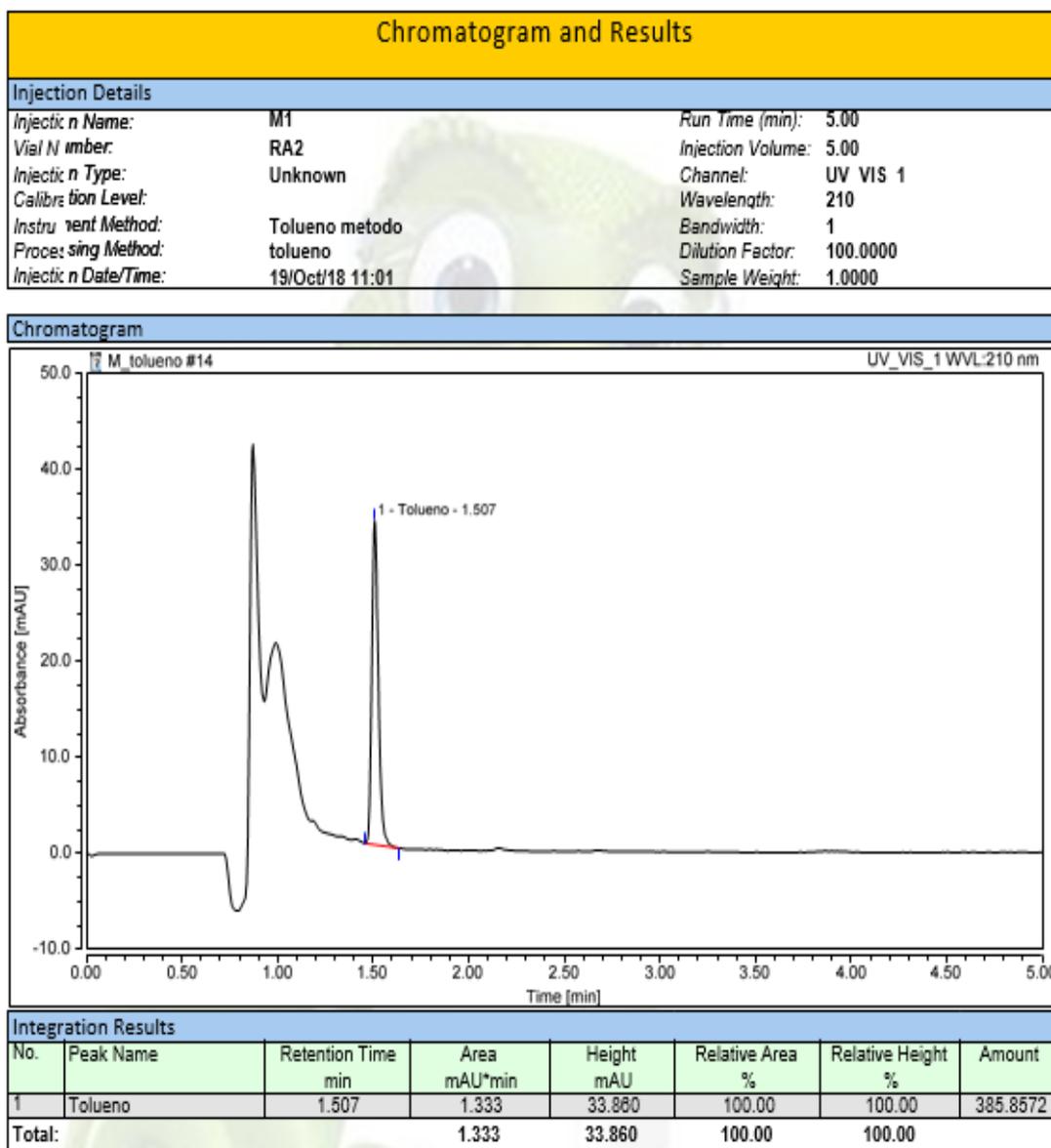
## Curva de calibrado cromatograma de HPLC

Calibration			
Calibration Details		Tolueno	
Calibration Type	Lin	Offset (C0)	0.0000
Evaluation Type	Area	Slope (C1)	0.3456
Number of Calibration Points	12	Curve (C2)	0.0000
Number of disabled Calibration Points	0	R-Square	0.9998



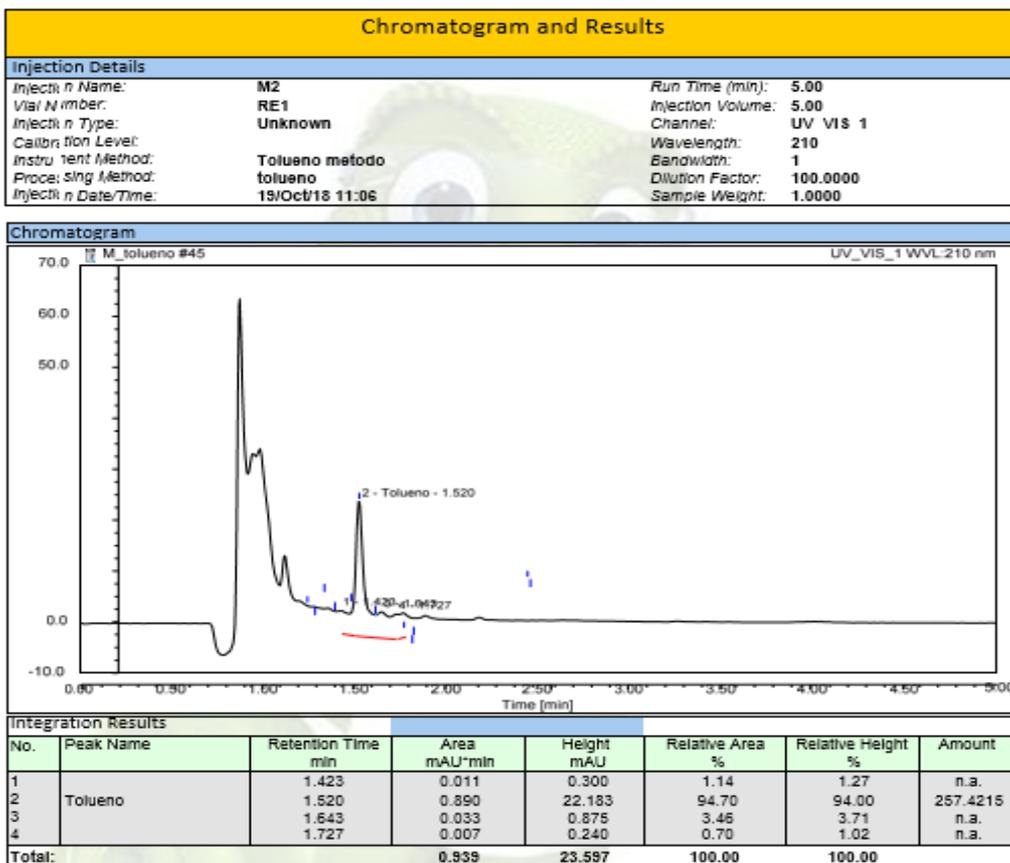
Calibration Results		Tolueno					
No.	Injection Name	Calibration Level	X Value	Y Value	Y Value	Area	Height
			UV VIS 1 Tolueno	UV VIS 1 Tolueno	UV VIS 1 Tolueno	mAU*min UV VIS 1 Tolueno	mAU UV VIS 1 Tolueno
1	1	1	0.2289	0.0709	0.0709	0.071	2.036
2	2	2	1.1444	0.3977	0.3977	0.398	10.970
3	3	3	2.0600	0.7254	0.7254	0.725	20.516
4	4	4	2.9755	1.0405	1.0405	1.040	29.441
5	5	5	3.8911	1.3264	1.3264	1.326	37.806
6	6	6	4.8066	1.6226	1.6226	1.623	46.253
7	7	7	5.7222	1.9856	1.9856	1.986	56.502
8	8	8	6.6378	2.2945	2.2945	2.295	65.017
9	9	9	7.5533	2.6346	2.6346	2.635	74.774
10	10	10	8.4689	2.9140	2.9140	2.914	83.630
11	11	11	9.3844	3.2503	3.2503	3.250	92.564
12	12	12	10.3000	3.5589	3.5589	3.559	101.588

## Muestra Control 7 días



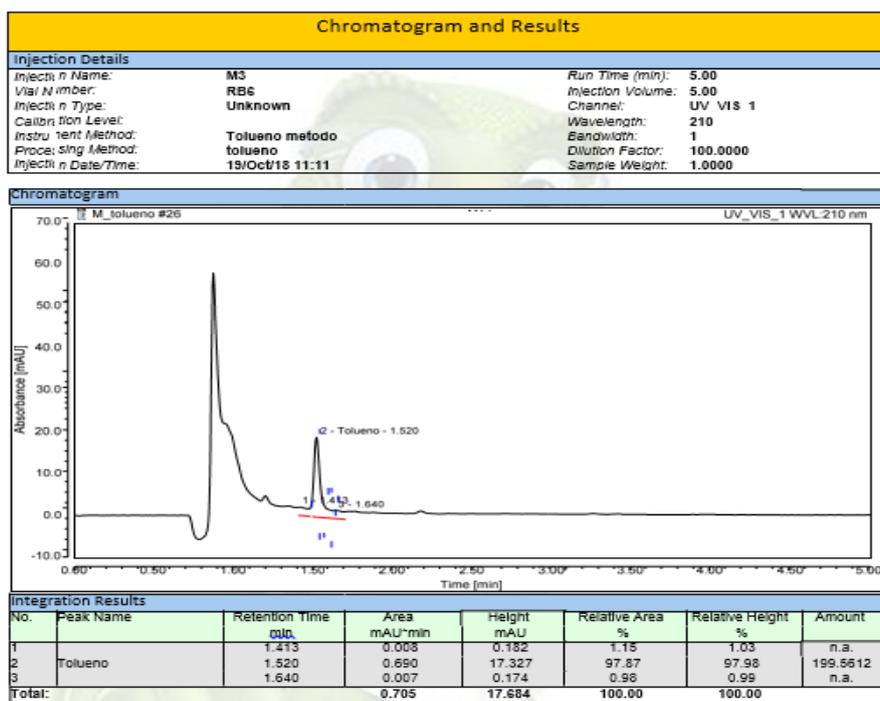
**Según** el cromatograma de HPLC de la muestra control (BLANCO) está en fusión a la absorbancia vs el tiempo, y utilizando una longitud de onda de 210 nm. Nos muestra una absorbancia de 33.860 (mAU) y en un tiempo de 1.507 min dándonos como resultado 385.8572 ppm lo que quiere decir que existe **385.8572** miligramos de concentración de Tolueno por litro de solución.

## Muestra de la concentración $30 \times 10^4$ a los 7 días -replica 1

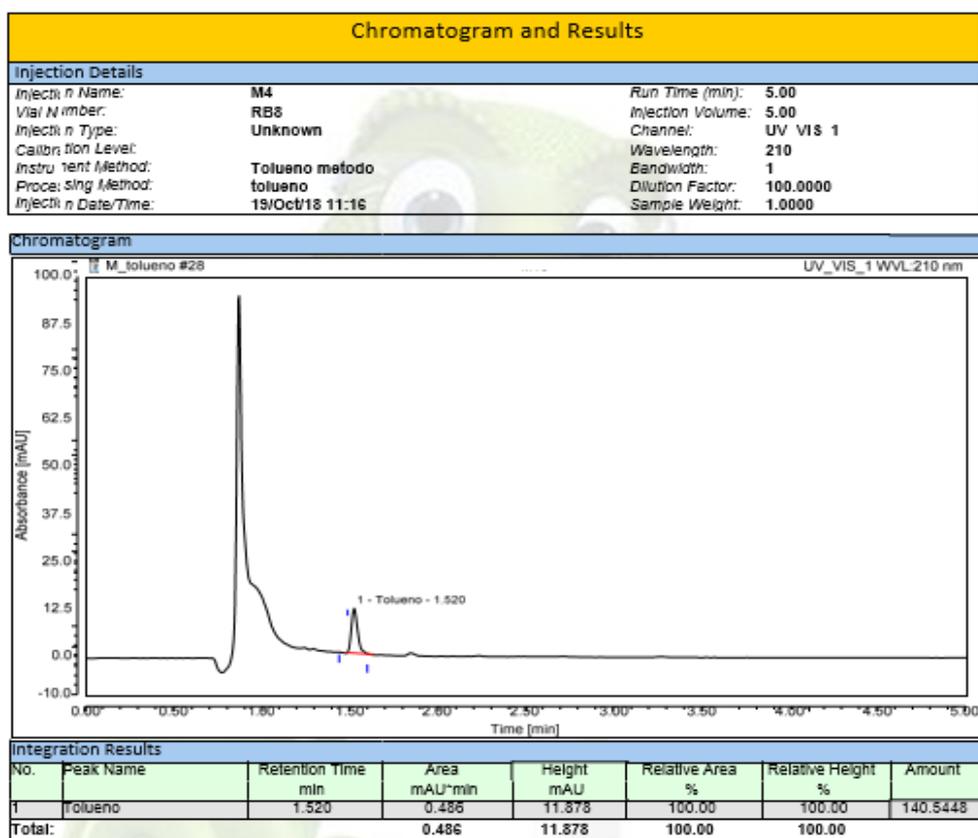


**Según** el cromatograma de HPLC de la muestra de la concentración de  $30 \times 10^4$  de tolueno en la réplica 1. Nos muestra una altura de absorbancia de 23.597 (mAU) y en un tiempo de 1.727 min dándonos como resultado 257.4215 ppm lo que quiere decir que existe **257.4215** miligramos de concentración de Tolueno por litro de solución.

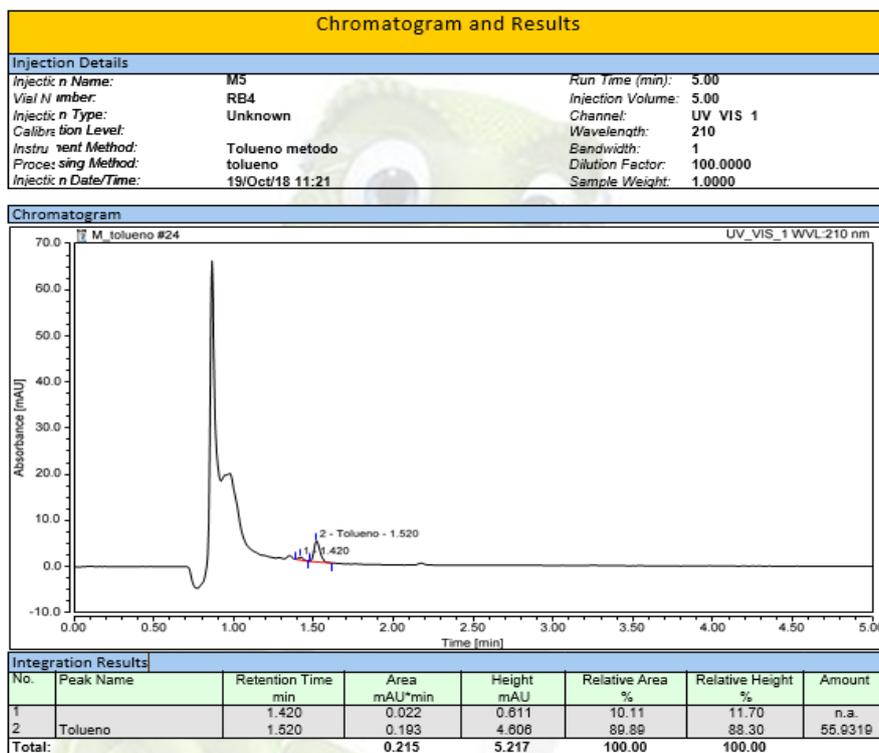
## Muestra de la concentración $30 \cdot 10^4$ a los 7 días -replica 2



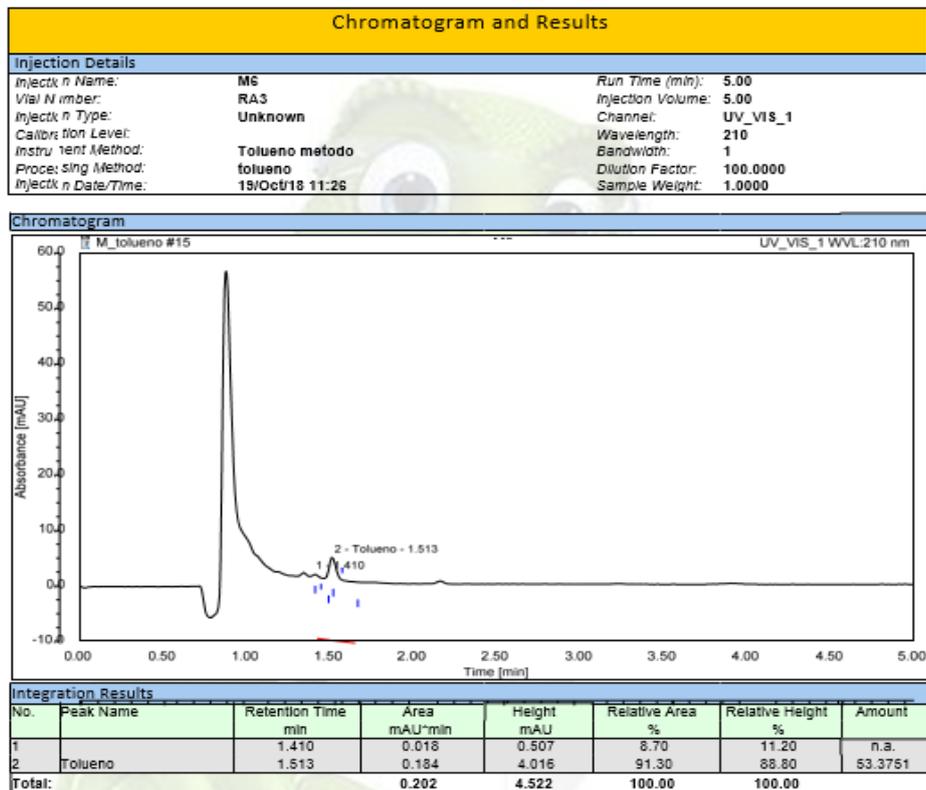
## Muestra de la concentración $30 \cdot 10^4$ a los 7 días -replica 3



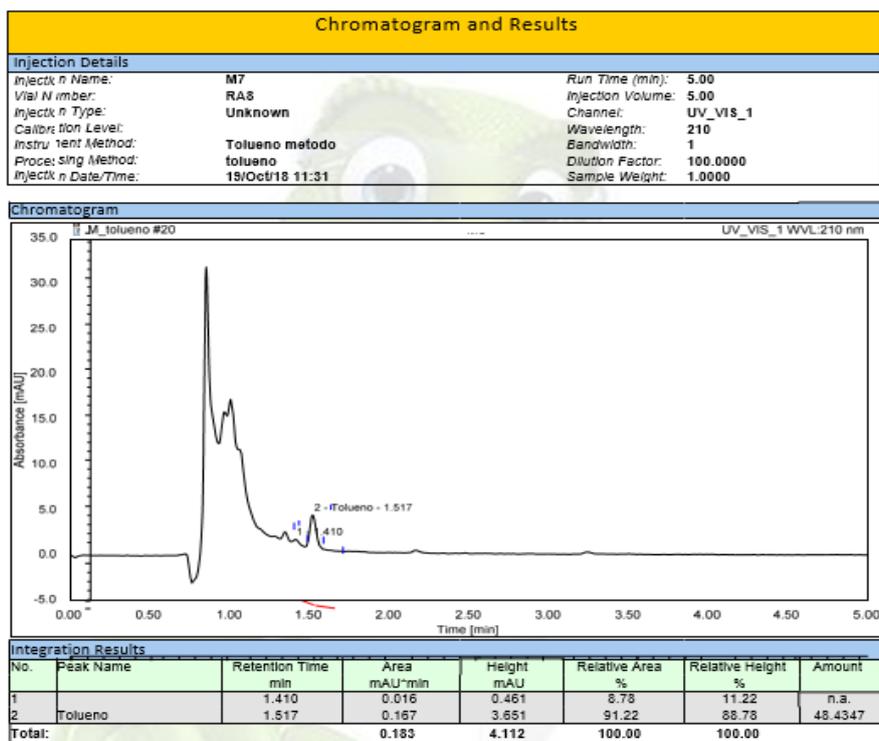
## Muestra de la concentración $30 \cdot 10^6$ a los 7 días -replica 1



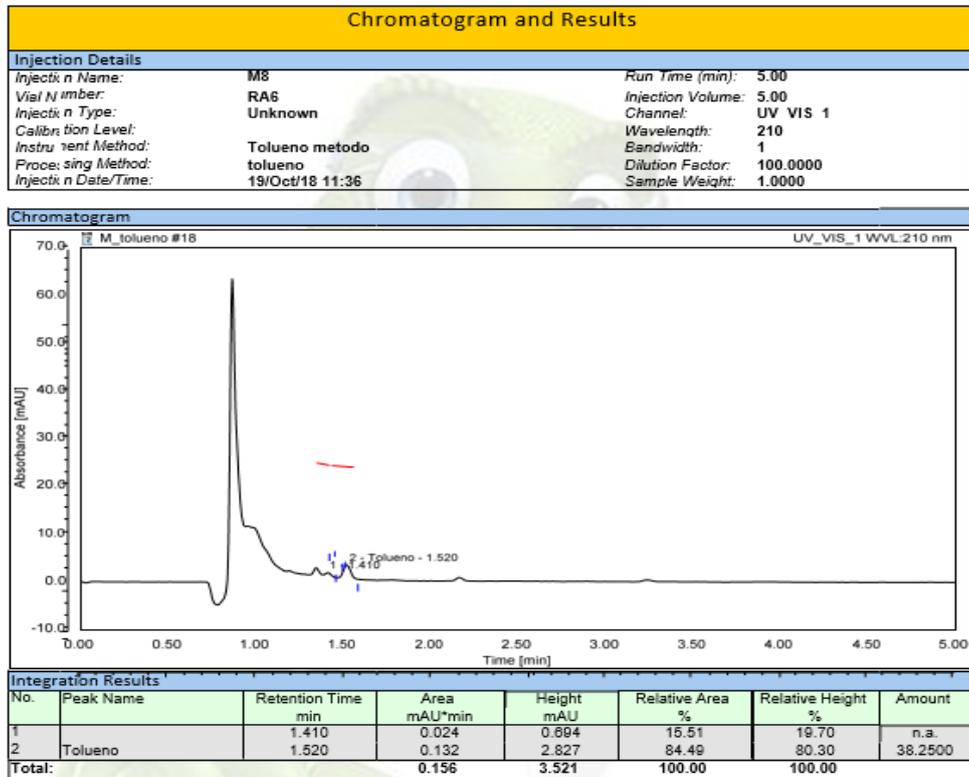
## Muestra de la concentración $30 \cdot 10^6$ a los 7 días -replica 2



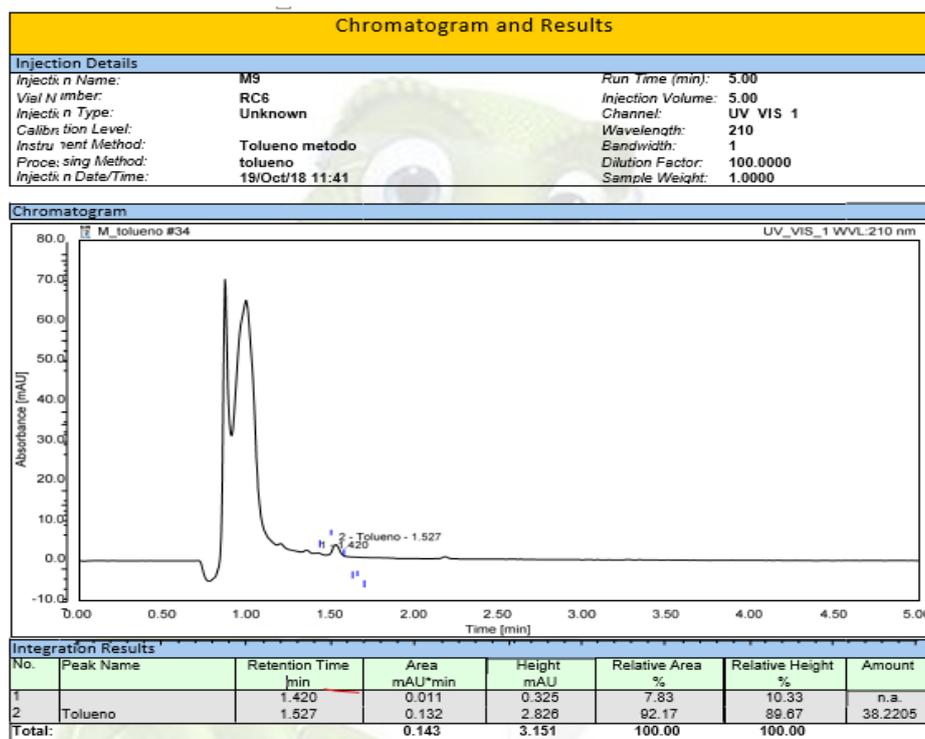
### Muestra de la concentración $30 \cdot 10^6$ a los 7 días -replica 3



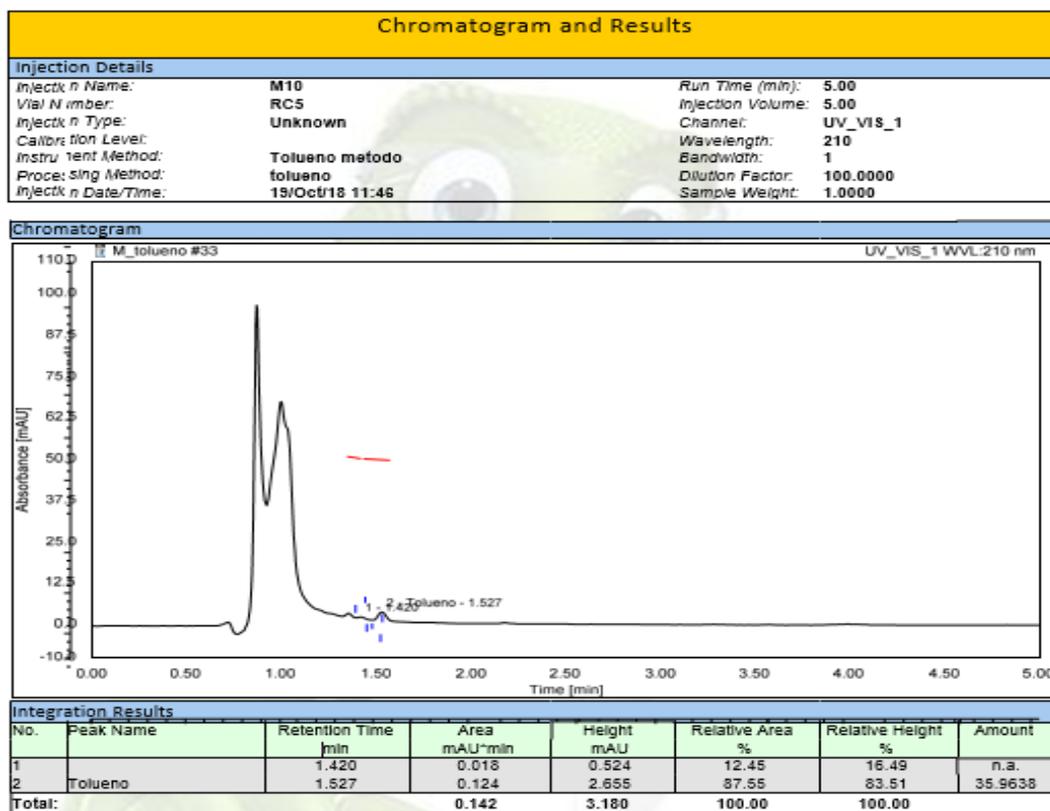
### Muestra de la concentración $30 \cdot 10^8$ a los 7 días -replica 1



## Muestra de la concentración $30 \cdot 10^8$ a los 7 días -replica 2



## Muestra de la concentración $30 \cdot 10^8$ a los 7 días -replica 3



## RESULTADOS A LOS 14 DÍAS

**Determinación de Peso seco de las muestras para evaluar el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* a los 14 días.**

Replica	[ ] de <i>P.aeruginosa</i>	Peso de capacho(inicial)	Peso de capacho(final)	Peso Neto
Matraz 1	10 <sup>8</sup>	0.135900	0.142600	0.006700
Matraz 2	10 <sup>8</sup>	0.154200	0.159300	0.005100
Matraz 3	10 <sup>8</sup>	0.147600	0.151900	0.004300
Matraz 1	10 <sup>6</sup>	0.155600	0.158300	0.002700
Matraz 2	10 <sup>6</sup>	0.155500	0.158300	0.002800
Matraz 3	10 <sup>6</sup>	0.150800	0.153500	0.002700
Matraz 1	10 <sup>4</sup>	0.151400	0.152700	0.001300
Matraz 2	10 <sup>4</sup>	0.138100	0.139100	0.001000
Matraz 3	10 <sup>4</sup>	0.157800	0.158700	0.000900
Control	Blanco	0.139000	0.139100	0.000100

**Tabla 3.-** Se puede observar en la primera columna el número de réplicas en la segunda columna muestra las concentraciones de *Pseudomonas aeruginosa*, en la tercera columna indica el peso del capacho inicial en (gr) en la cuarta columna muestra el peso del capacho final en (gr) luego de a ver agregado las muestras de *Pseudomonas aeruginosa*, en la última columna se observa el peso neto de *P. aeruginosa* presente en cada concentración respecto a la réplica.

10 <sup>8</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.006700	0.005100	0.004300

10 <sup>6</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.002700	0.002800	0.002700

10 <sup>4</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.001300	0.001000	0.000900

Control	Matraz 1
	0.000000

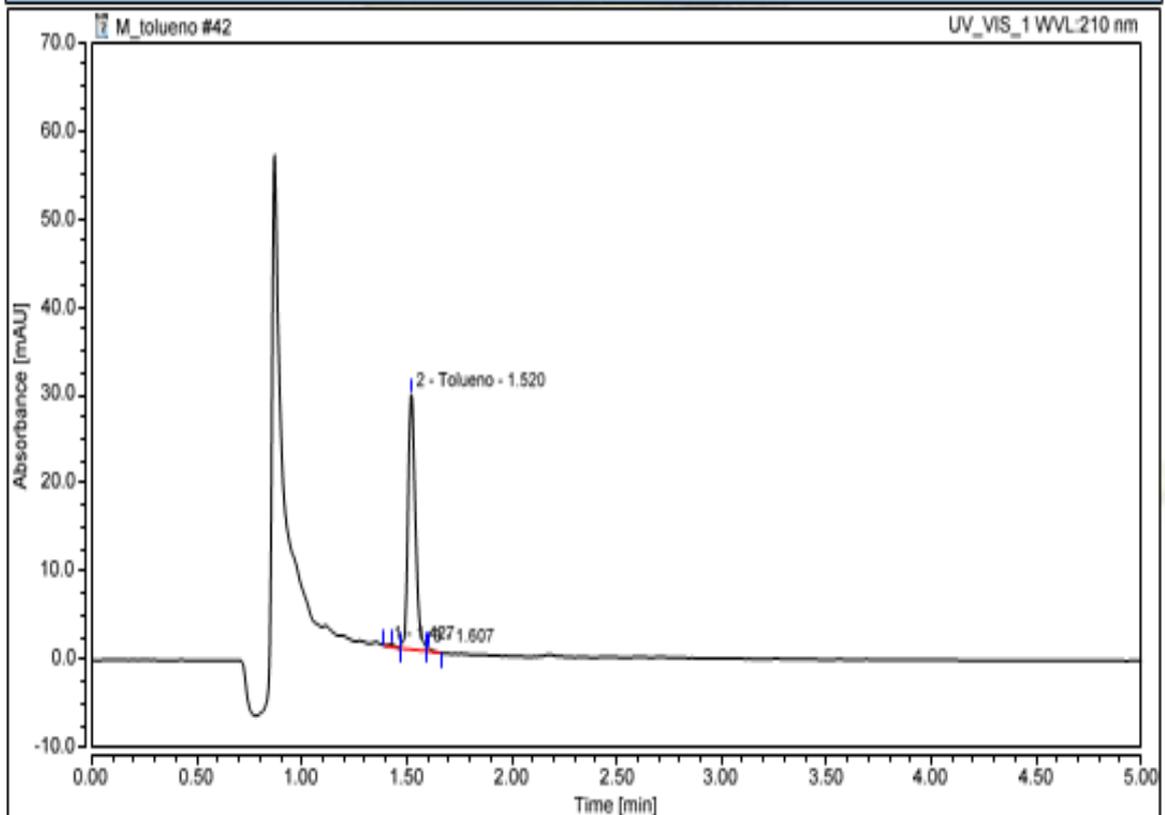
**Resumen del Peso Seco de las muestras a los 14 días.**

## Muestra control (BLANCO)

### Chromatogram and Results

Injection Details		
Injection Name:	M11	Run Time (min): 5.00
Vial Number:	RD6	Injection Volume: 5.00
Injection Type:	Unknown	Channel: UV VIS 1
Calibration Level:		Wavelength: 210
Instrument Method:	Tolueno metodo	Bandwidth: 1
Processing Method:	tolueno	Dilution Factor: 100.0000
Injection Date/Time:	26/Oct/18 16:03	Sample Weight: 1.0000

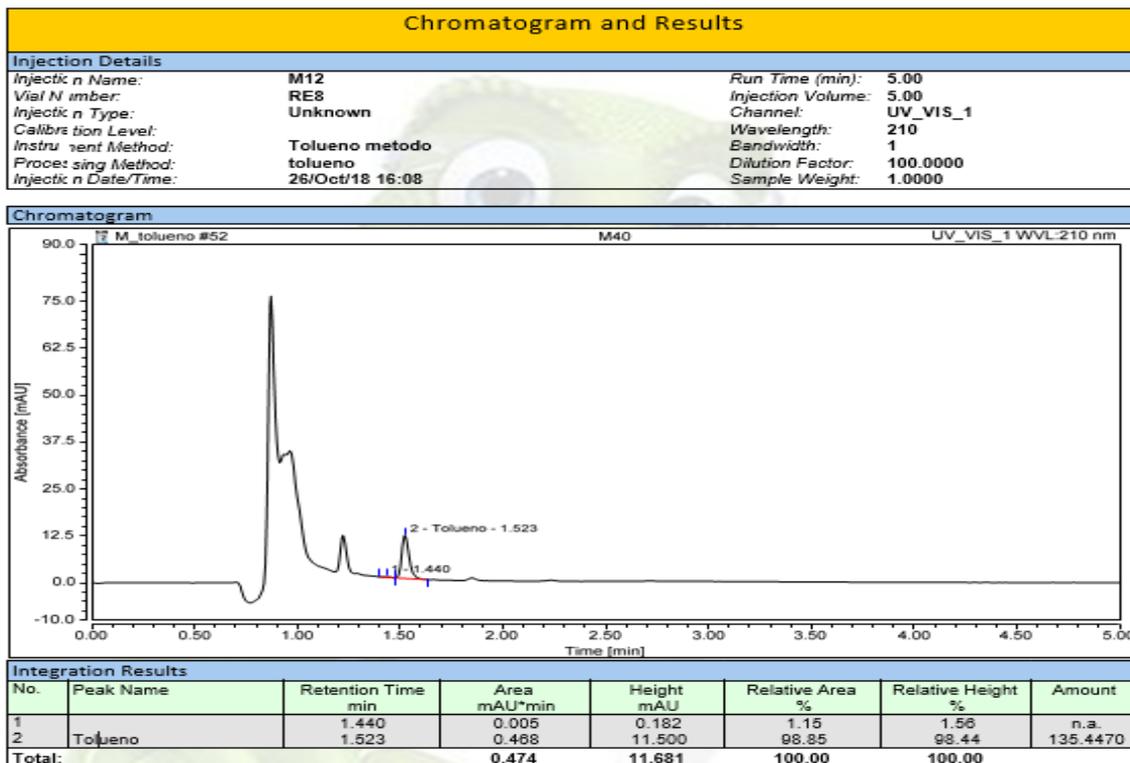
### Chromatogram



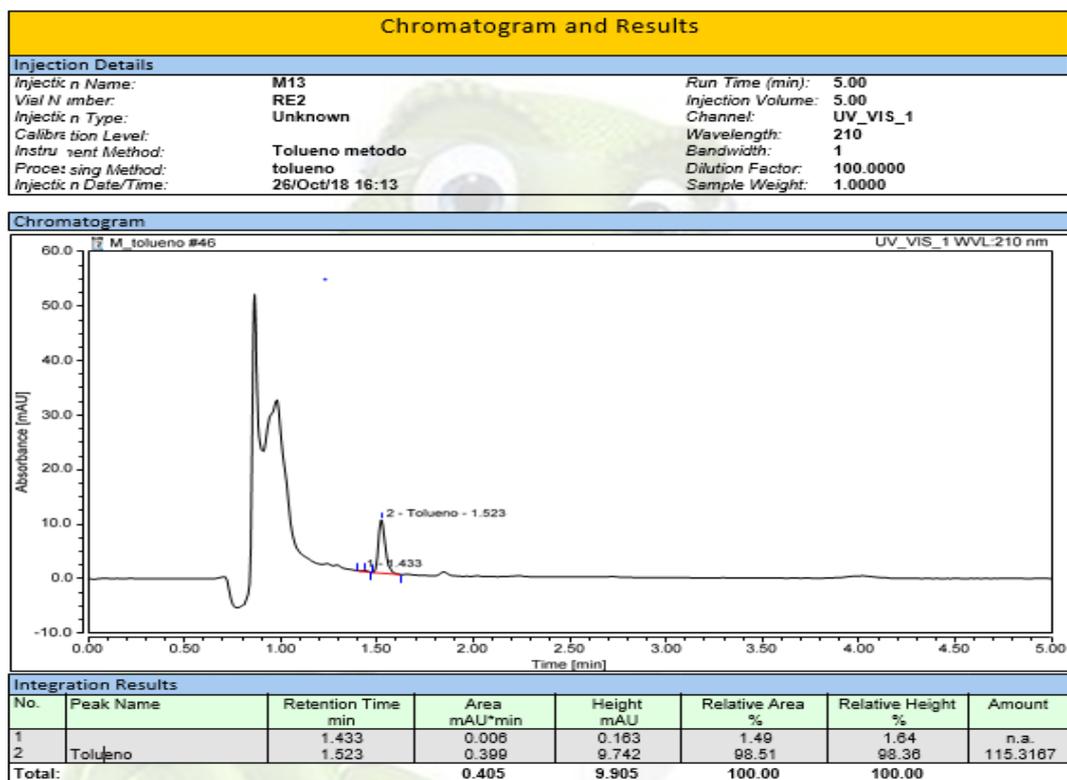
### Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1		1.427	0.009	0.267	0.77	0.90	n.a.
2	Tolueno	1.520	1.156	28.914	98.46	97.91	371.0002
3		1.607	0.009	0.352	0.77	1.19	n.a.
Total:			1.174	29.533	100.00	100.00	

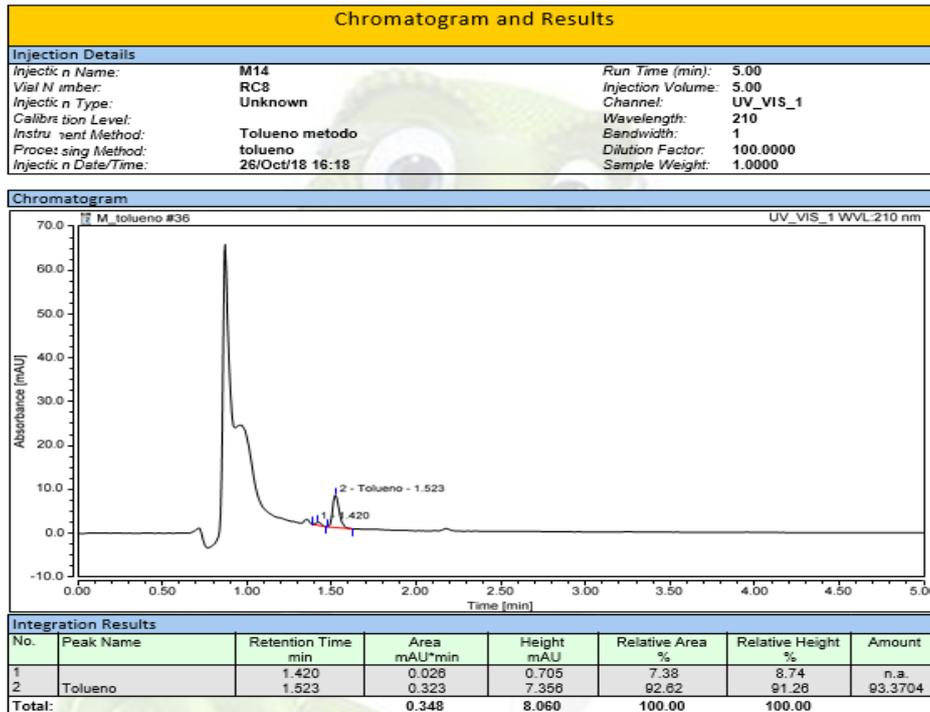
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 14 días -replica 1



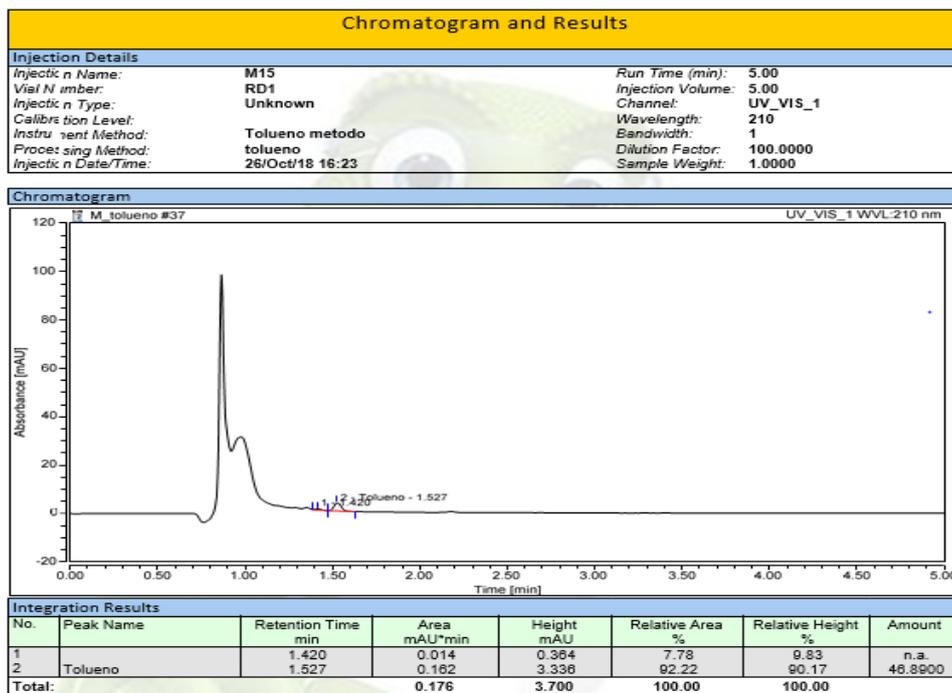
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 14 días- replica 2



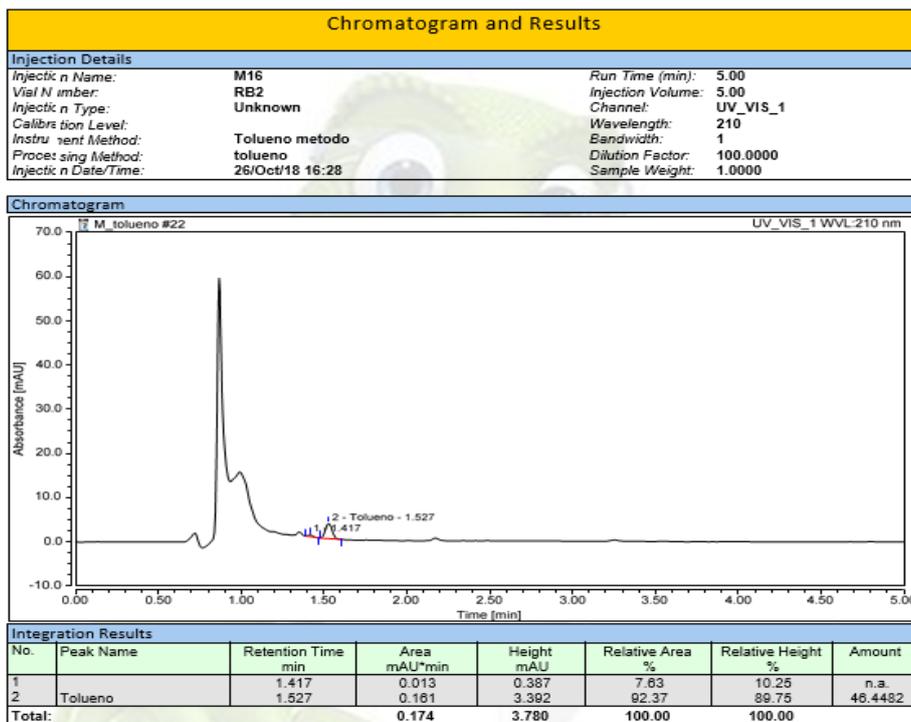
### Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 14 días- replica 3



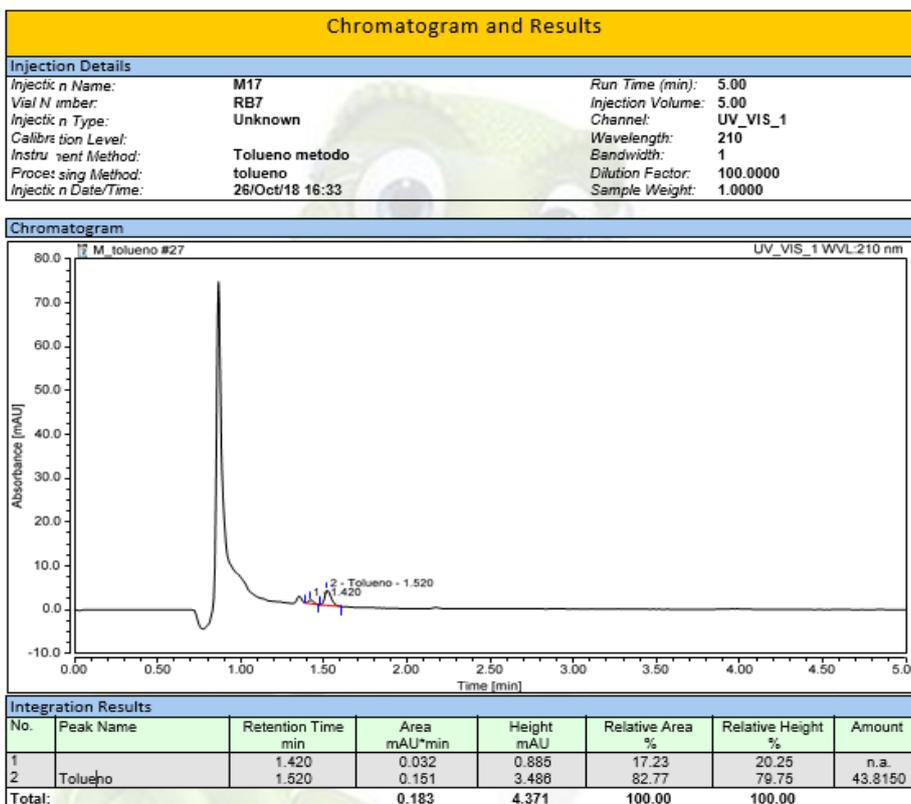
### Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 14 días- replica 1



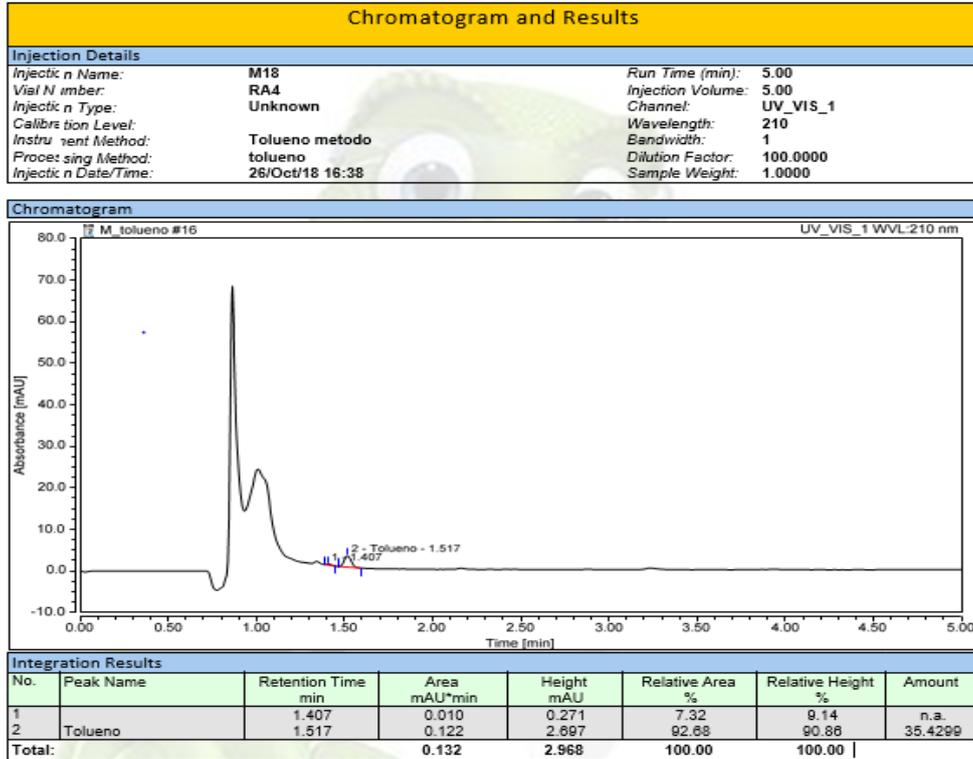
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 14 días- replica 2



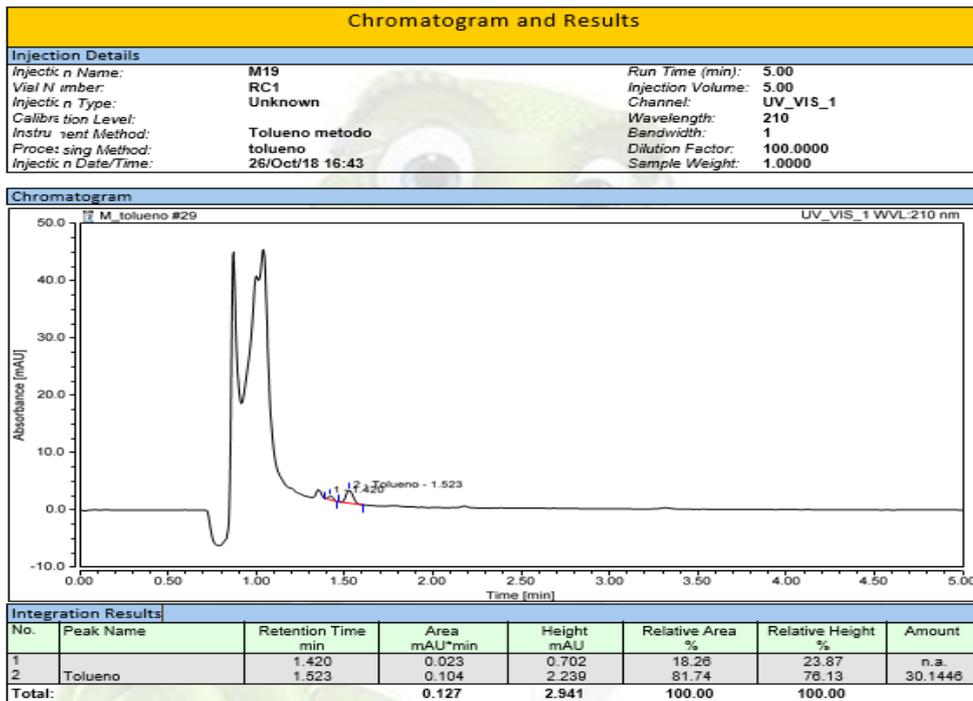
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 14 días -replica 3



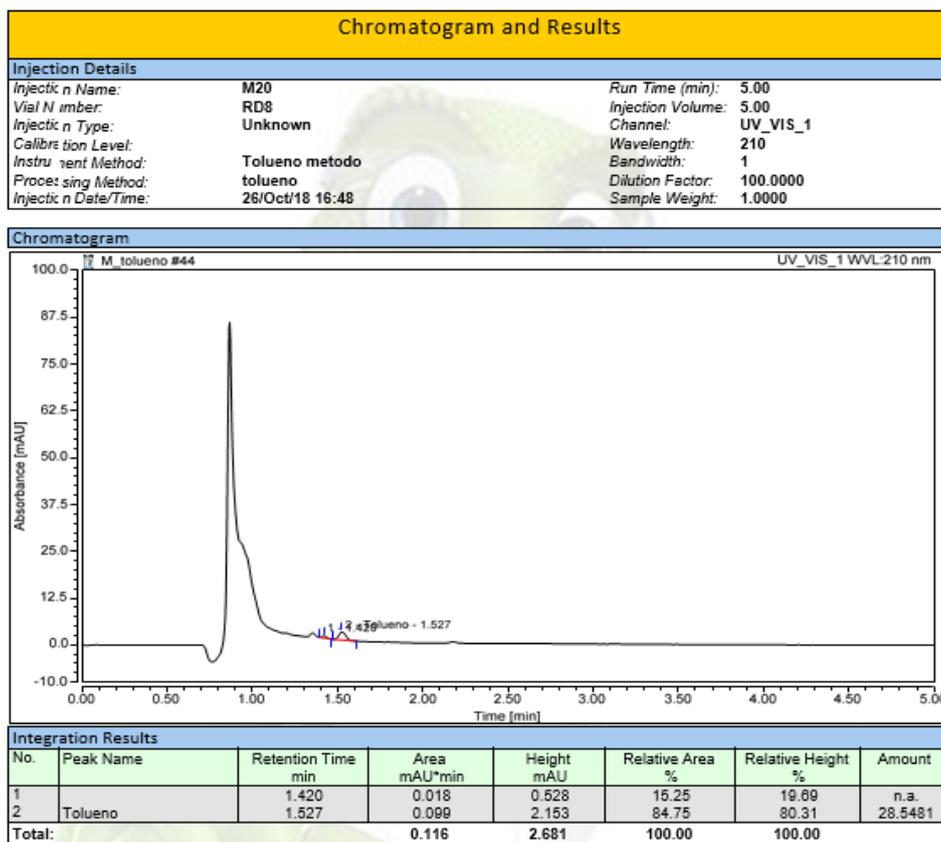
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 14 días -replica 1



## Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 14 días -replica 2



## Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 14 días -replica 3



## RESULTADOS A LOS 21 DÍAS

**Determinación de Peso seco de las muestras para evaluar el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* a los 21 días.**

Replica	[ ] de <i>P.aeruginosa</i>	Peso de capacho(inicial)	Peso de capacho(final)	Peso Neto
Matraz 1	$10^8$	0.126300	0.133980	0.007680
Matraz 2	$10^8$	0.120200	0.127700	0.007500
Matraz 3	$10^8$	0.138100	0.145000	0.006900
Matraz 1	$10^6$	0.128200	0.131600	0.003400
Matraz 2	$10^6$	0.125300	0.128900	0.003600
Matraz 3	$10^6$	0.127900	0.131400	0.003500
Matraz 1	$10^4$	0.130800	0.133800	0.003000
Matraz 2	$10^4$	0.134900	0.138400	0.003500
Matraz 3	$10^4$	0.121700	0.124500	0.002800
Control	Blanco	0.118600	0.118800	0.000200

Se puede observar en la primera columna el número de réplicas en la segunda columna muestra las concentraciones de *Pseudomonas auriginosa*, en la tercera columna indica el peso del capacho inicial en (gr) en la cuarta columna muestra el peso del capacho final en (gr) luego de a ver agregado las muestras de *Pseudomonas auriginosa*, en la última columna se observa el peso neto de *P. auriginosa* presente en cada concentración respecto a la réplica.

10 <sup>8</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.007680	0.007500	0.006900

10 <sup>6</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.003400	0.003600	0.003500

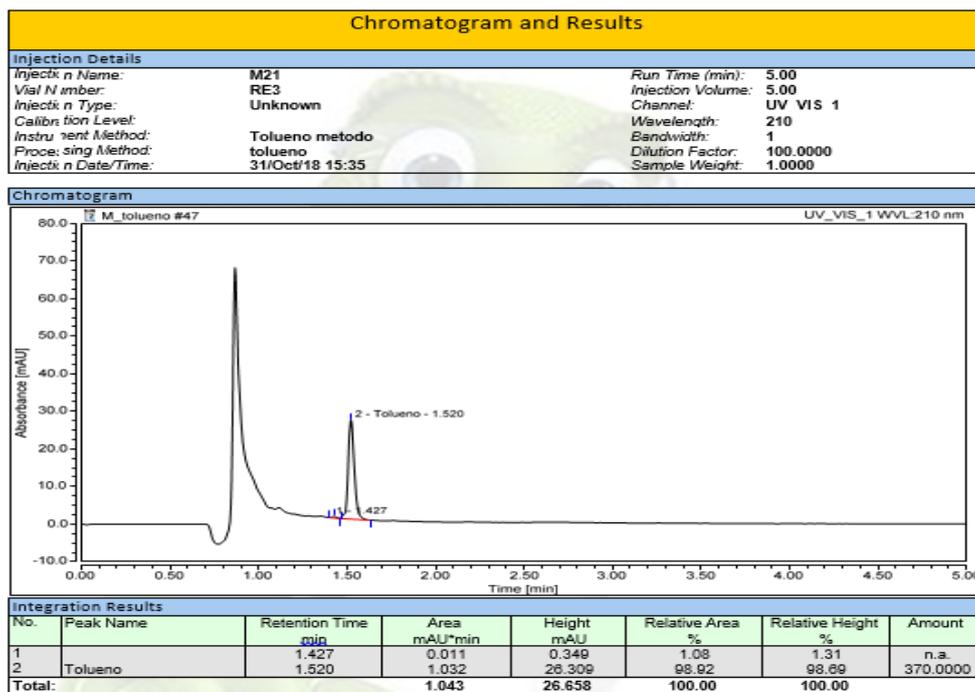
10 <sup>4</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.003000	0.003500	0.002800

Control	Matraz 1
	0.000000

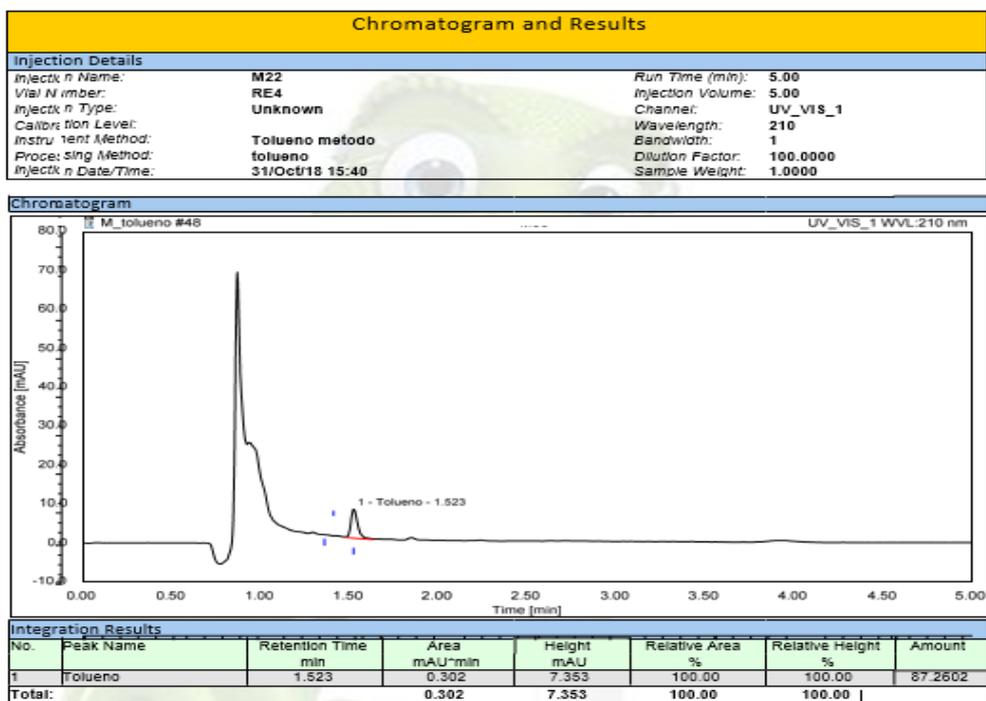
### **Resumen del Peso Seco de las muestras a los 21 días.**

## RESULTADOS A LOS 21 DÍAS

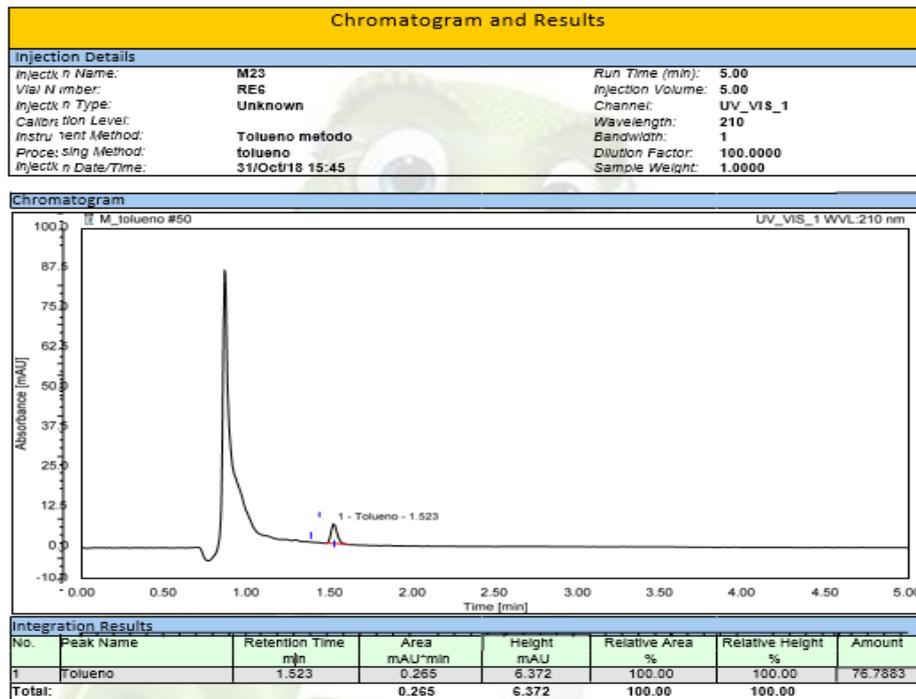
### Muestra control (BLANCO)



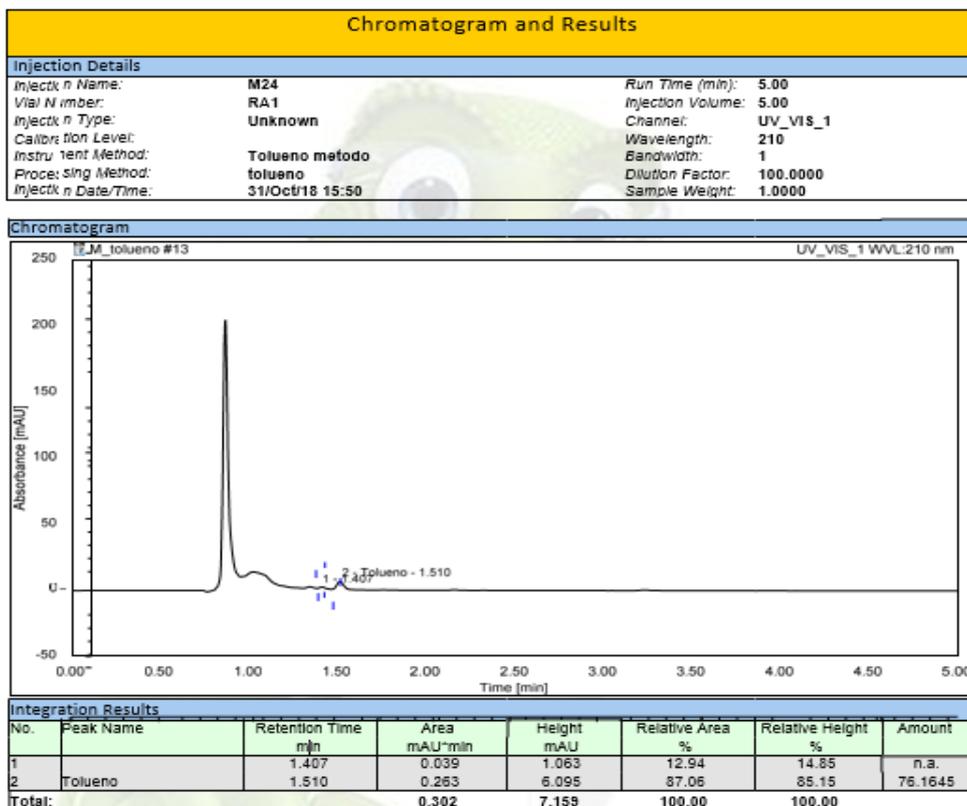
### Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 21 días -replica 1



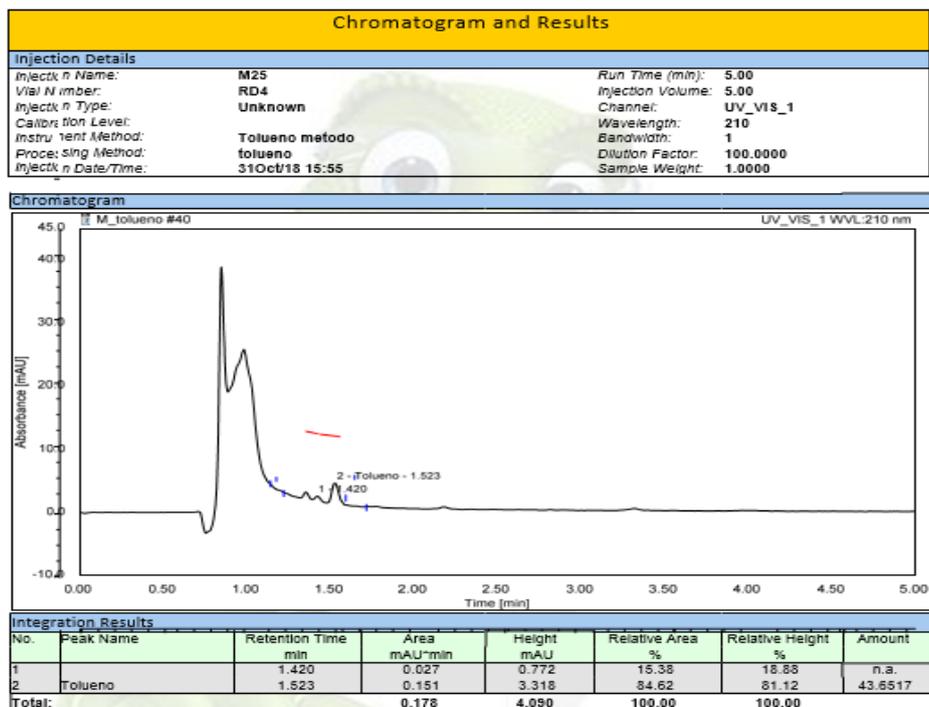
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 21 días- replica 2



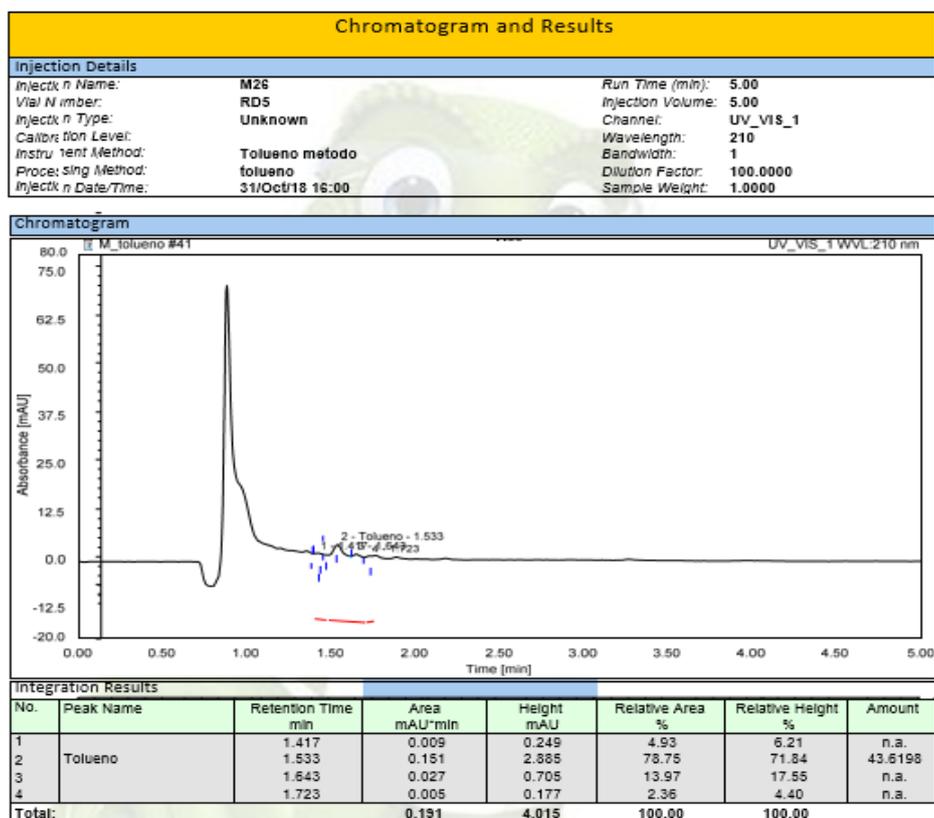
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 21 días- replica 3



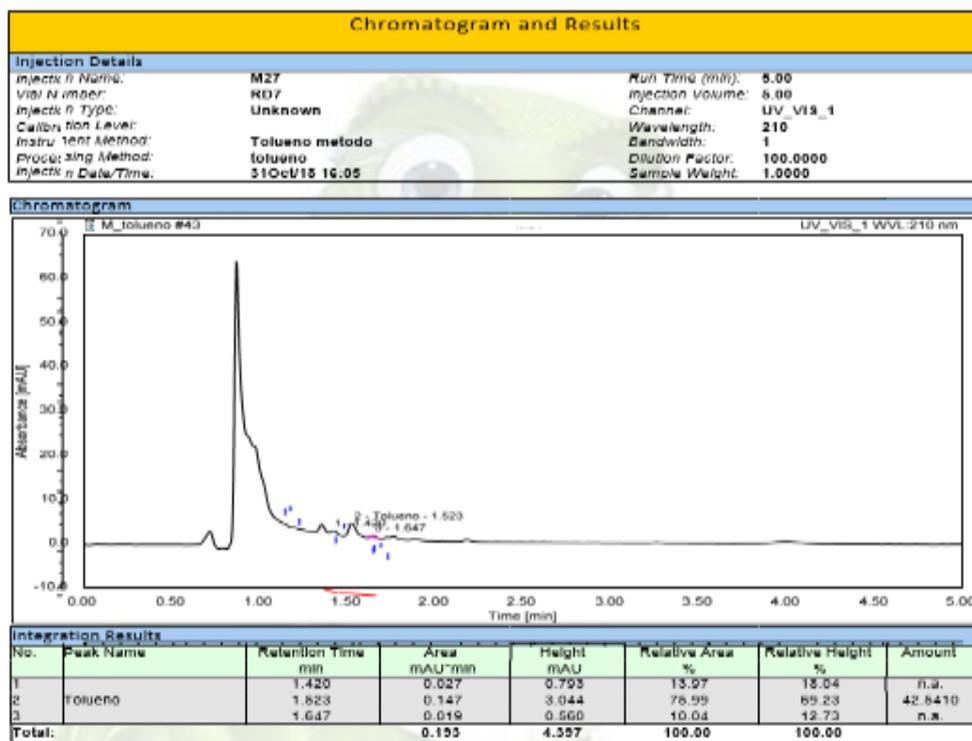
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 21 días- replica 1



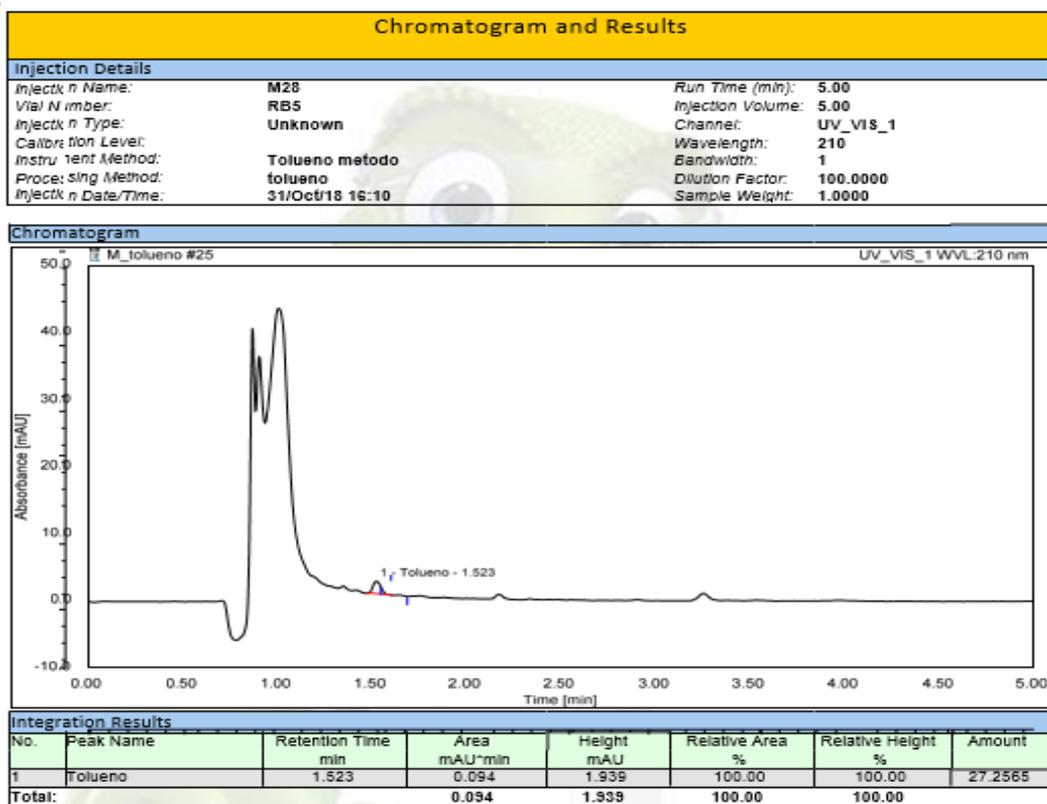
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 21 días- replica 2



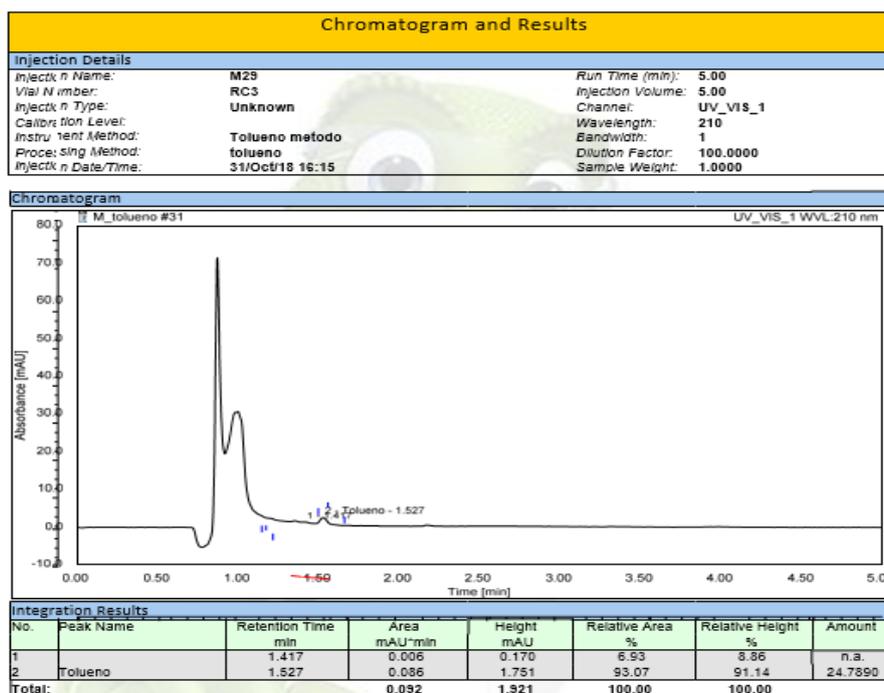
### Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 21 días -replica 3



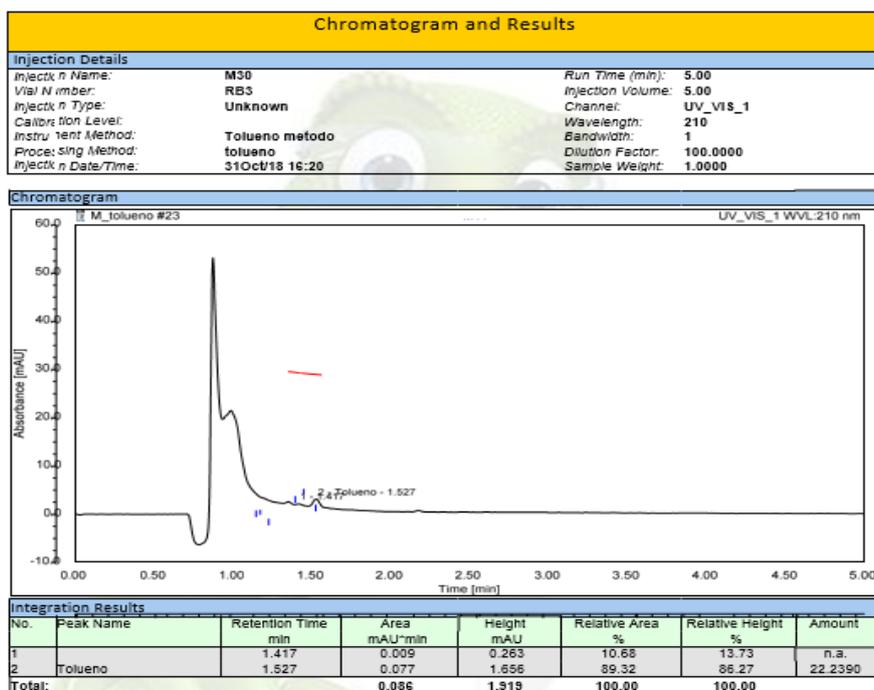
### Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 21 días -replica 1



## Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 21 días -replica 2



## Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 21 días -replica 3



## **RESUMEN DE RESULTADOS:**

	Blanco	blanco	blanco
	7 días	14 días	21 días
1	385.8572	334.4702	298.6317
	30*10 <sup>4</sup>	30*10 <sup>4</sup>	30*10 <sup>4</sup>
1	257.4215	135.4470	87.2602
2	199.5612	115.3167	76.7883
3	140.5448	93.3704	76.1645
	30*10 <sup>6</sup>	30*10 <sup>6</sup>	30*10 <sup>6</sup>
1	55.9319	46.8900	43.6517
2	53.3751	46.4482	43.6198
3	48.4347	43.8150	42.5410
	30*10 <sup>8</sup>	30*10 <sup>8</sup>	30*10 <sup>8</sup>
1	38.2500	35.4299	27.2565
2	38.2205	30.1446	24.789
3	35.9638	28.5481	22.2390

### **RESULTADOS A LOS 28 DÍAS**

**Determinación de Peso seco de las muestras para evaluar el crecimiento de Pseudomonas aeruginosa a los 28 días.**

Replica	[ ] de P.aeruginosa	Peso de capacho(inicial)	Peso de capacho(final)	Peso Neto
Matraz 1	10 <sup>8</sup>	0.146000	0.156500	0.010500
Matraz 2	10 <sup>8</sup>	0.139600	0.149900	0.010300
Matraz 3	10 <sup>8</sup>	0.154300	0.163900	0.009600
Matraz 1	10 <sup>6</sup>	0.124300	0.129900	0.005600
Matraz 2	10 <sup>6</sup>	0.128400	0.132800	0.004400
Matraz 3	10 <sup>6</sup>	0.144900	0.149700	0.004800
Matraz 1	10 <sup>4</sup>	0.149100	0.152800	0.003700
Matraz 2	10 <sup>4</sup>	0.136300	0.140700	0.004400
Matraz 3	10 <sup>4</sup>	0.138300	0.141500	0.003200
Control	Blanco	0.159500	0.159700	0.000200

Se puede observar en la primera columna el número de réplicas en la segunda columna muestra las concentraciones de *Pseudomonas auriginosa*, en la tercera columna indica el peso del capacho inicial en (gr) en la cuarta columna muestra el peso del capacho final en (gr) luego de haber agregado las muestras de *Pseudomonas auriginosa*, en la última columna se observa el peso neto de *P. auriginosa* presente en cada concentración respecto a la réplica.

10 <sup>8</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.010500	0.010300	0.009600

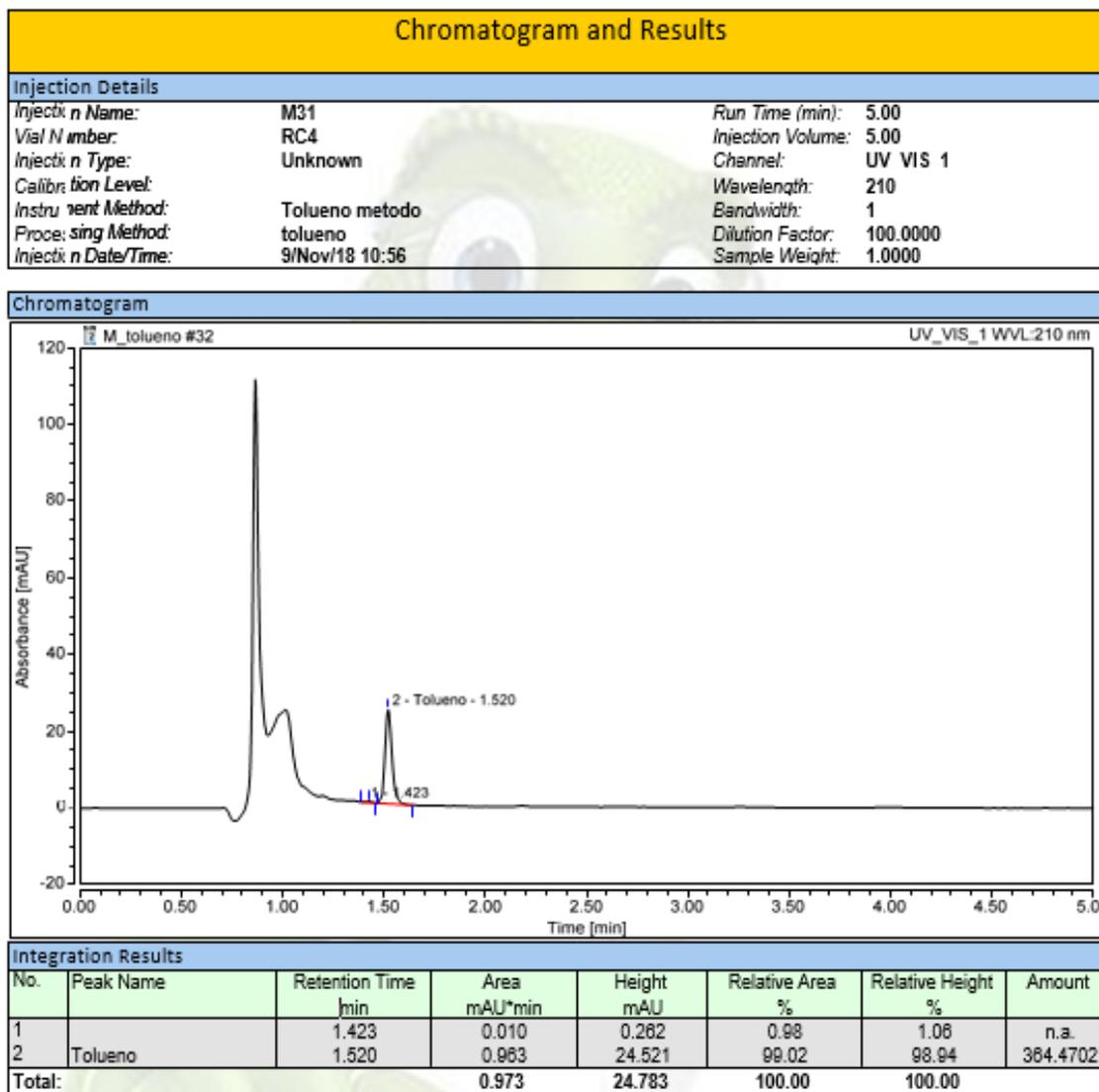
10 <sup>6</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.005600	0.004400	0.004800

10 <sup>4</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.003700	0.004400	0.003200

Control	Matraz 1
	0.00000

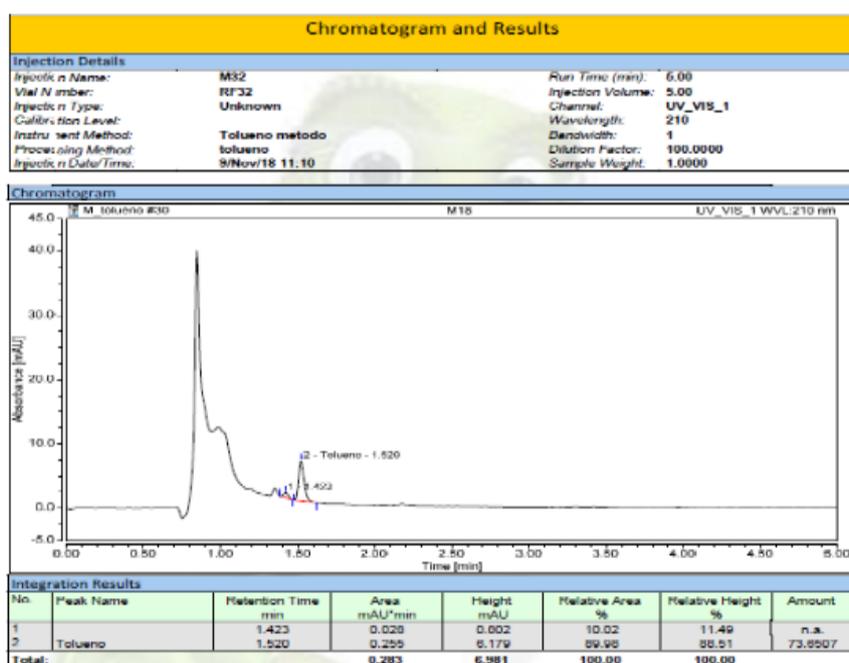
**Resumen del Peso Seco de las muestras a los 28 días.**

## Muestra control (BLANCO)

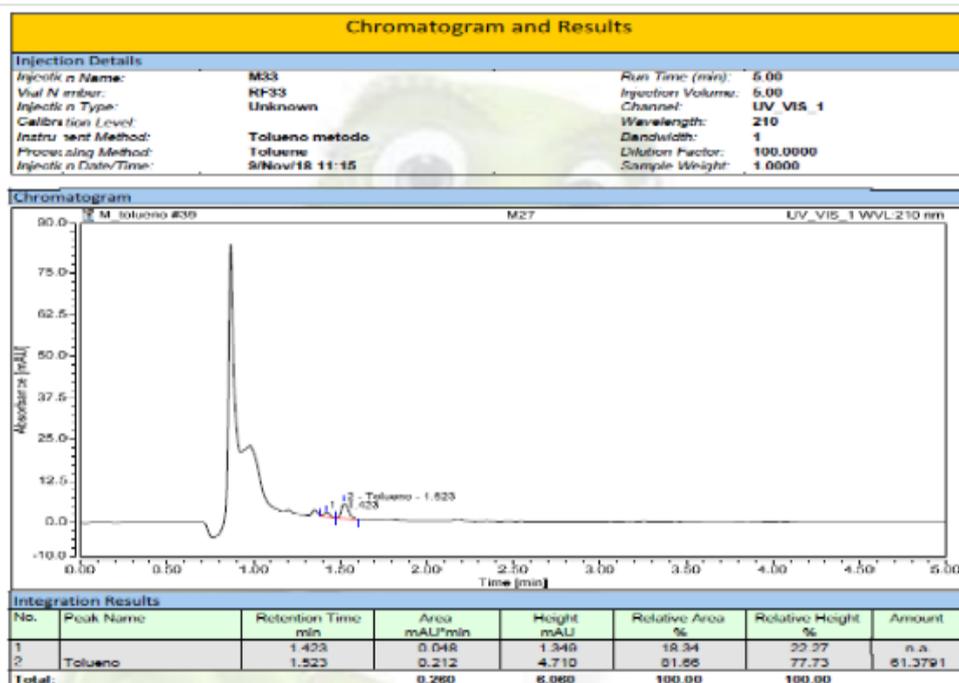


**Según** el cromatograma de HPLC de la muestra control (está en fusión a la absorbancia vs el tiempo., nos muestra una absorbancia de 24.521 (mAU) y en un tiempo de 1.520 min dándonos como resultado 364.4702 ppm lo que quiere decir que existe **364.4702** miligramos de concentración de Tolueno por litro de solución.

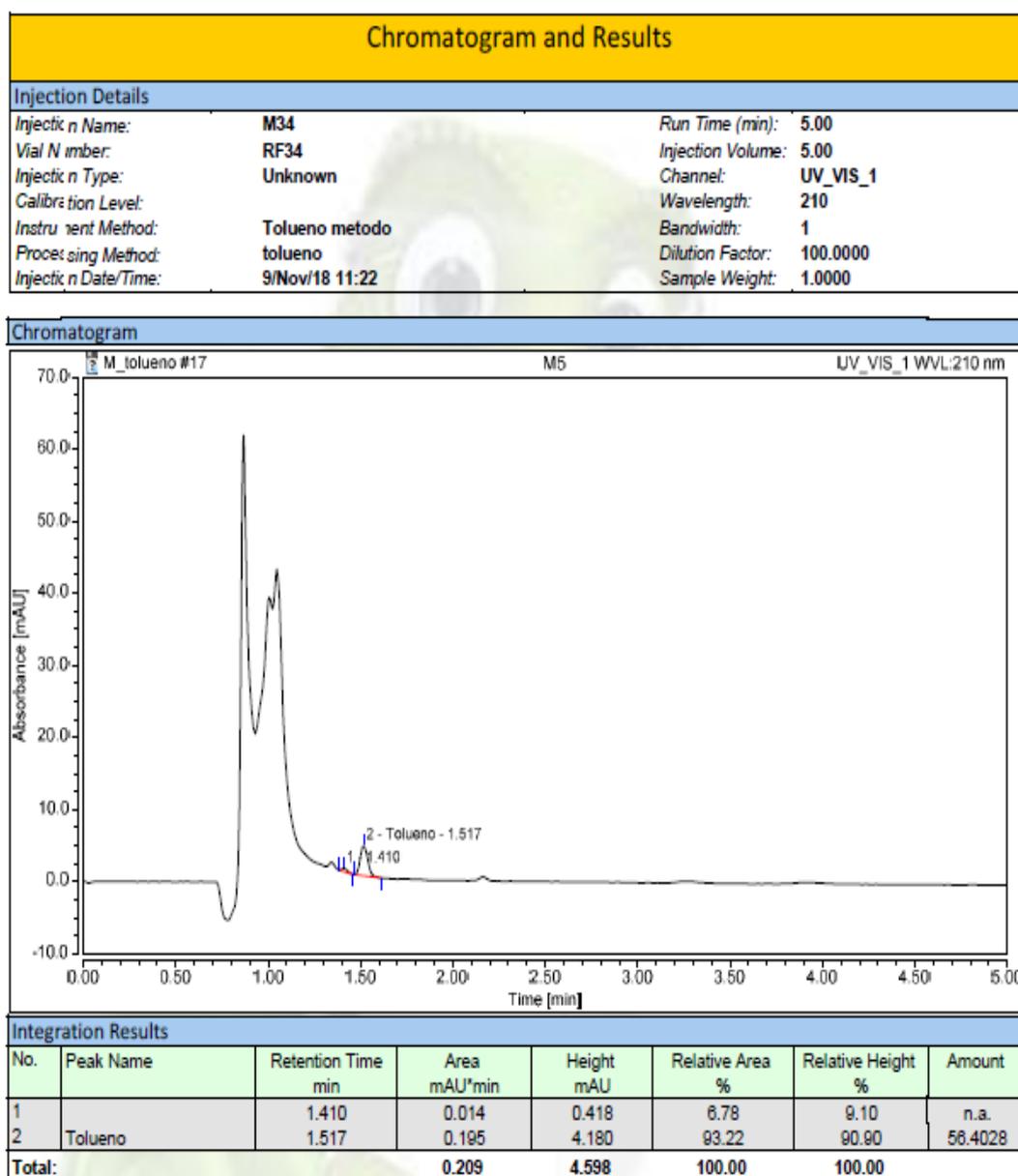
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 28 días -replica 1



## Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 28 días -replica 2

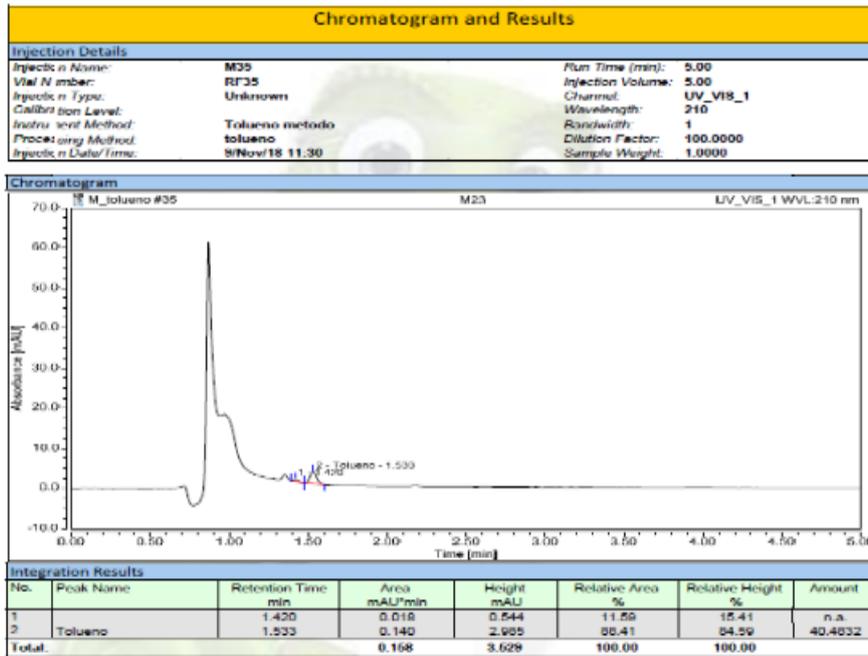


### Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 28 días -replica 3

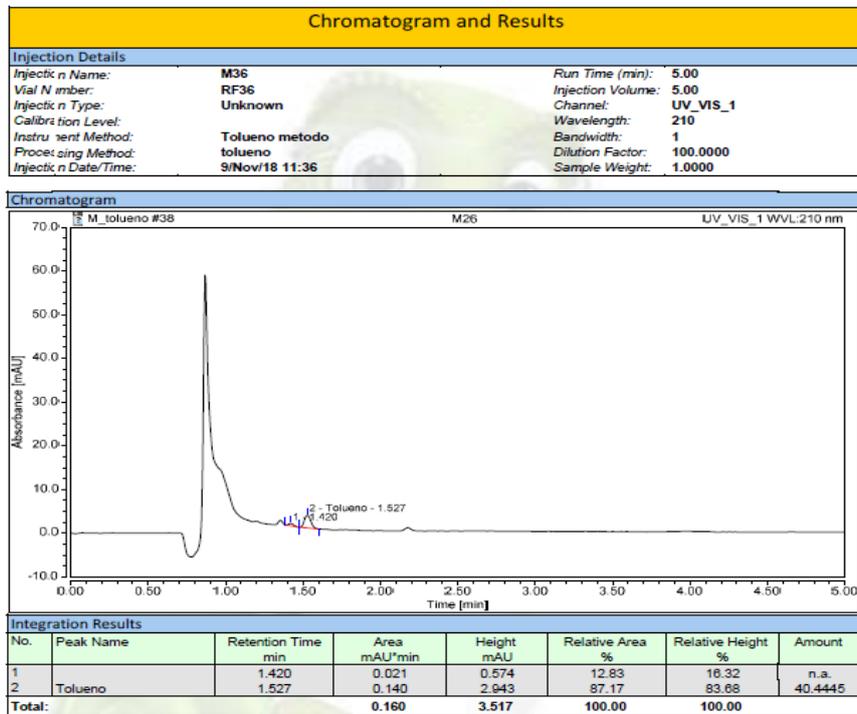


**Según** el cromatograma de HPLC de la muestra de la concentración de  $30 \times 10^4$  de tolueno en la réplica 1. Nos muestra una altura de absorbancia de 0.255 (mAU) y en un tiempo de 1.520 min dándonos como resultado 73.6507 ppm lo que quiere decir que existe **73.6507** miligramos de concentración de Tolueno por litro de solución.

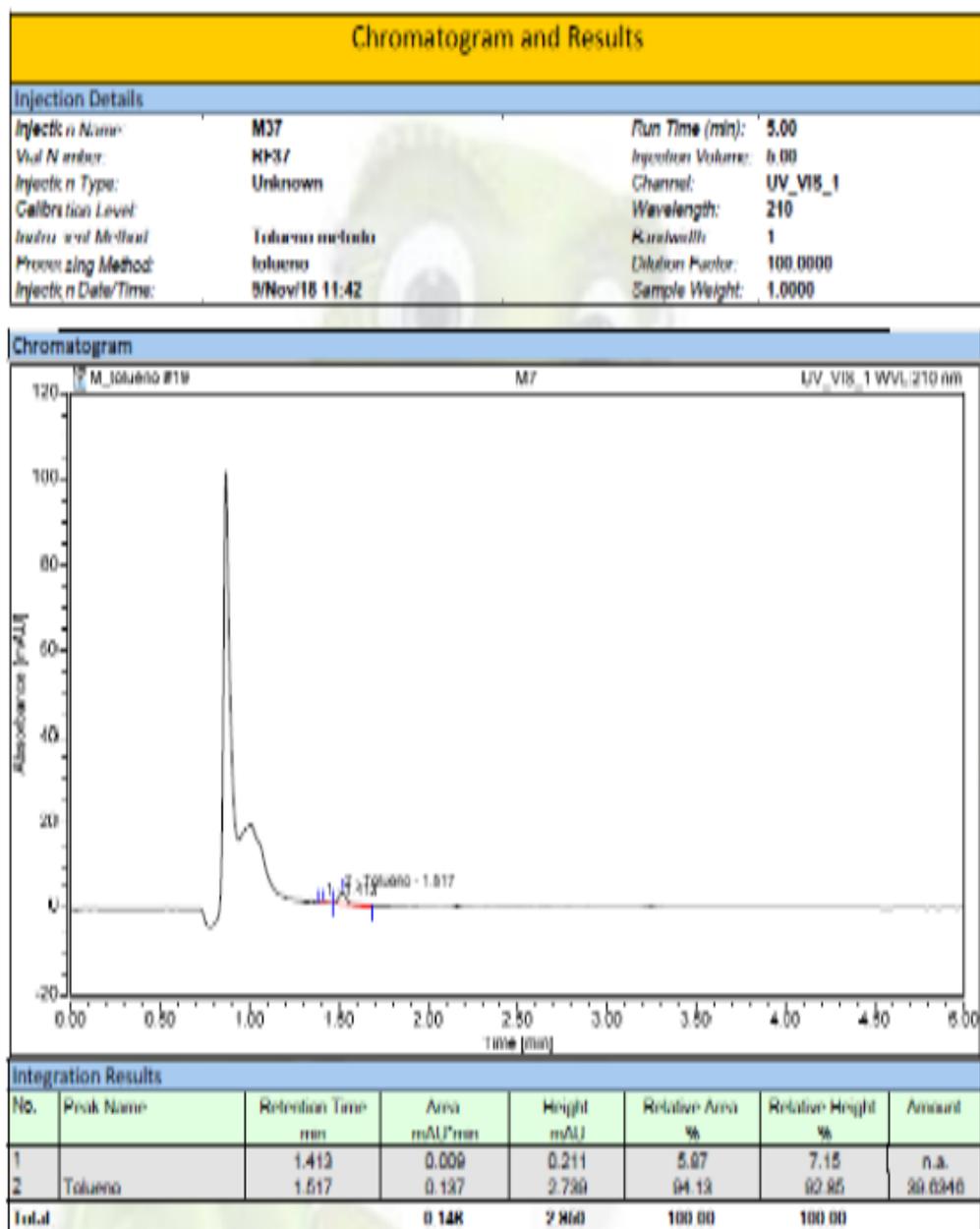
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 28 días -replica 1



## Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 28 días -replica 2

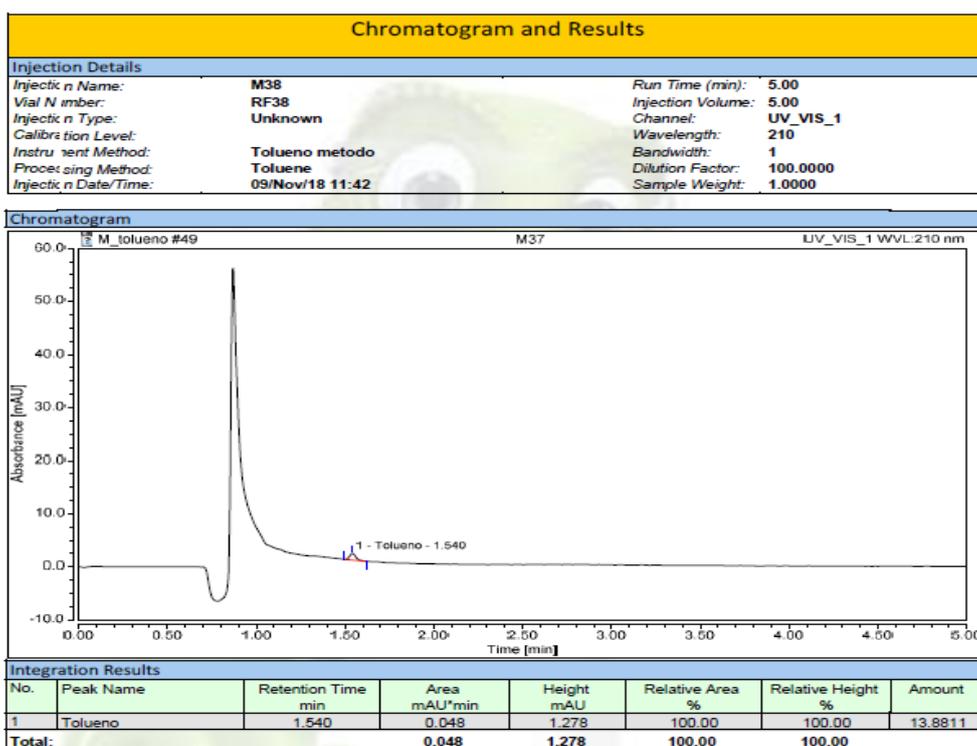


**Muestra de la concentración de  $30 \times 10^6$  a los 28 días -replica 3**

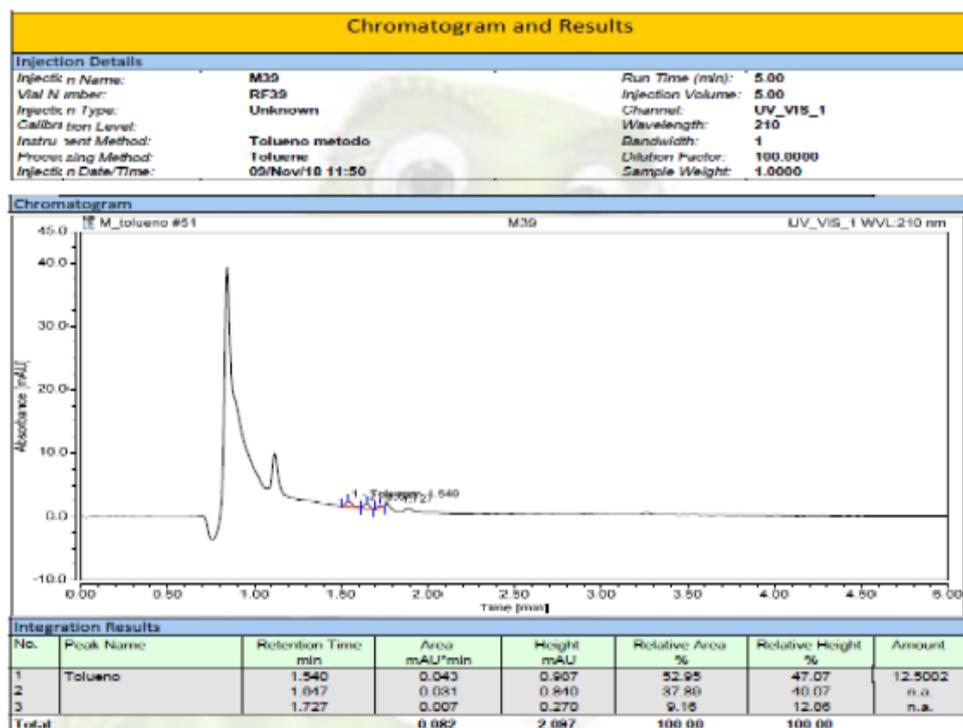


**Según** el cromatograma de HPLC de la muestra de la concentración de  $30 \times 10^6$  de tolueno. Nos muestra una altura de absorbancia de 0.140 (mAU) y en un tiempo de 1.5433 min dándonos como resultado 40.4832 ppm lo que quiere decir que existe **40.4832** miligramos de concentración de Tolueno por litro de solución.

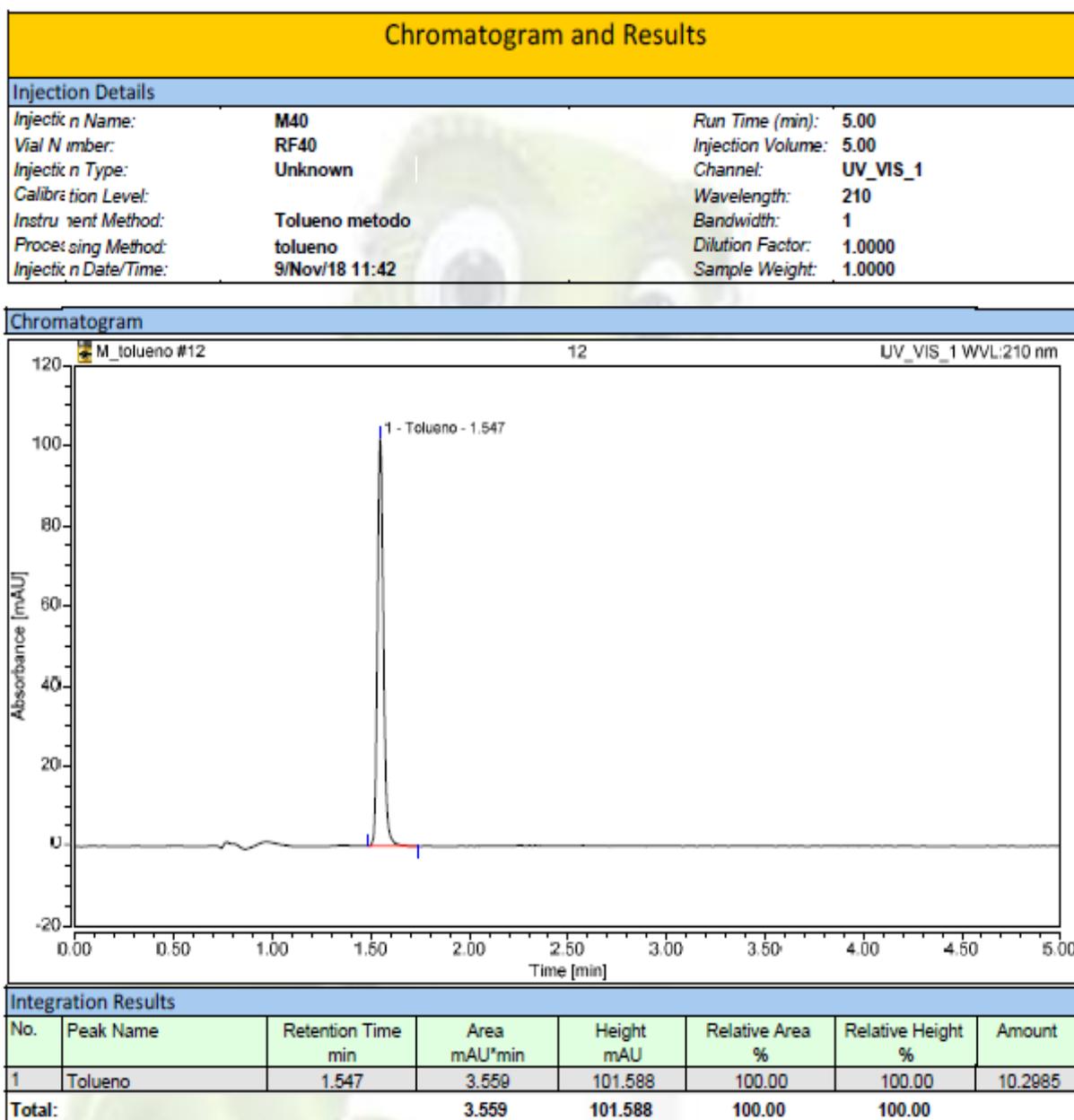
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 28 días -replica 1



## Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 28 días -replica 2



### Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 28 días -replica 3



**Según** el cromatograma de HPLC de la muestra de la concentración de  $30 \times 10^8$  de tolueno en la réplica 3. Nos muestra una altura de absorbancia de 3.559 (mAU) y en un tiempo de 1.547 min dándonos como resultado 10.2985 ppm lo que quiere decir que existe **10.2985** miligramos de concentración de Tolueno por litro de solución

### TERCERA REPLICAS:

#### Determinación de Peso -Muestras a los 7 días

[ ] de <i>P.aeuriginosa</i>	Peso de capacho(inicial)	Peso de capacho(final)	Peso Neto
10 <sup>8</sup>	0.120000	0.121000	0.001000
10 <sup>8</sup>	0.120000	0.129000	0.009000
10 <sup>8</sup>	0.119000	0.130000	0.011000
10 <sup>6</sup>	0.121000	0.127000	0.006000
10 <sup>6</sup>	0.116000	0.121000	0.005000
10 <sup>6</sup>	0.122000	0.128000	0.006000
10 <sup>4</sup>	0.118000	0.120000	0.002000
10 <sup>4</sup>	0.120000	0.121000	0.001000
10 <sup>4</sup>	0.119000	0.122000	0.003000
Blanco	0.117000	0.117000	0.000000

Se puede observar en la primera columna el número de réplicas en la segunda columna muestra las concentraciones de *Pseudomonas aeuriginosa*, en la tercera columna indica el peso del capacho inicial en (gr) en la cuarta columna muestra el peso del capacho final en (gr) luego de a ver agregado las muestras de *Pseudomonas aeuriginosa*, en la última columna se observa el peso neto de *P.aeuriginosa* presente en cada concentración respecto a la réplica.

10 <sup>8</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.001000	0.009000	0.011000

10 <sup>6</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.006000	0.005000	0.006000

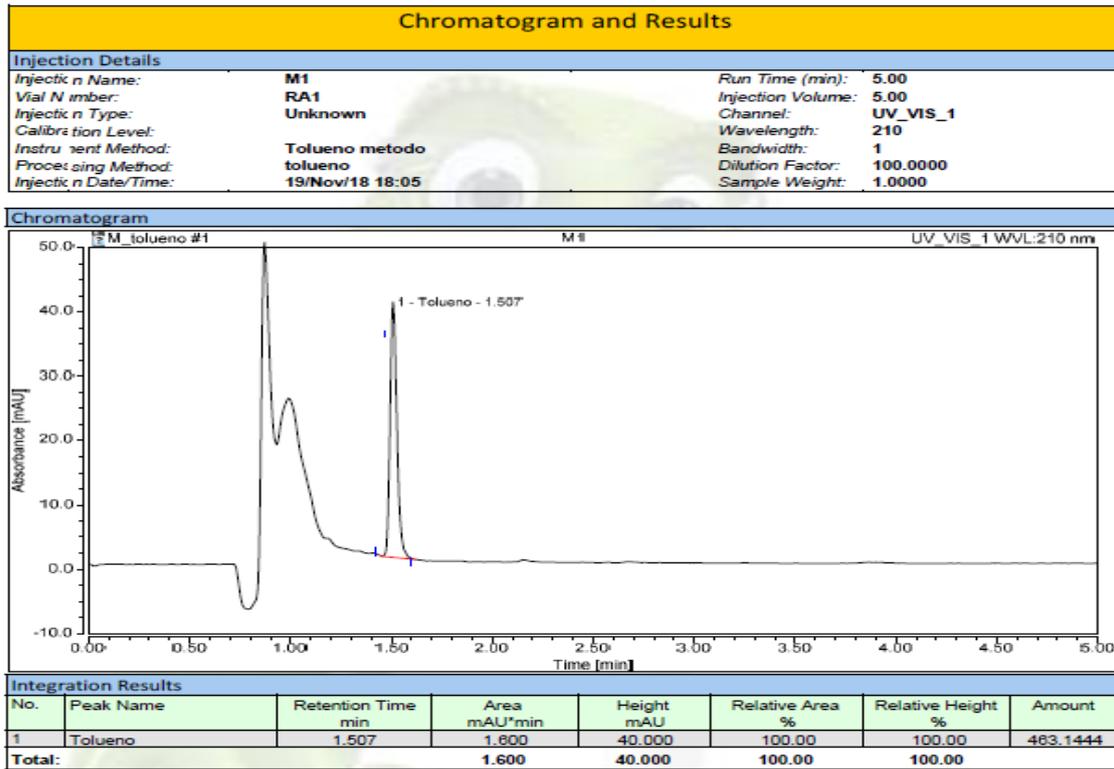
10 <sup>4</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.002000	0.001000	0.003000

Control	Matraz 1
	0.000000

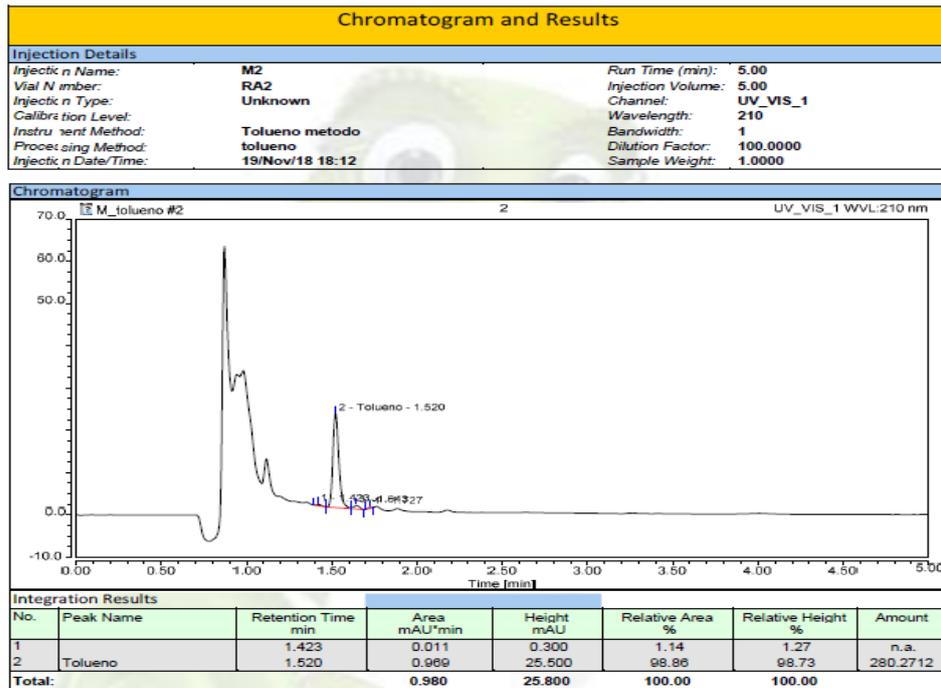
#### Resumen del Peso Seco de las muestras a los 7 días.

## Análisis de las muestras en cromatograma de HPLC

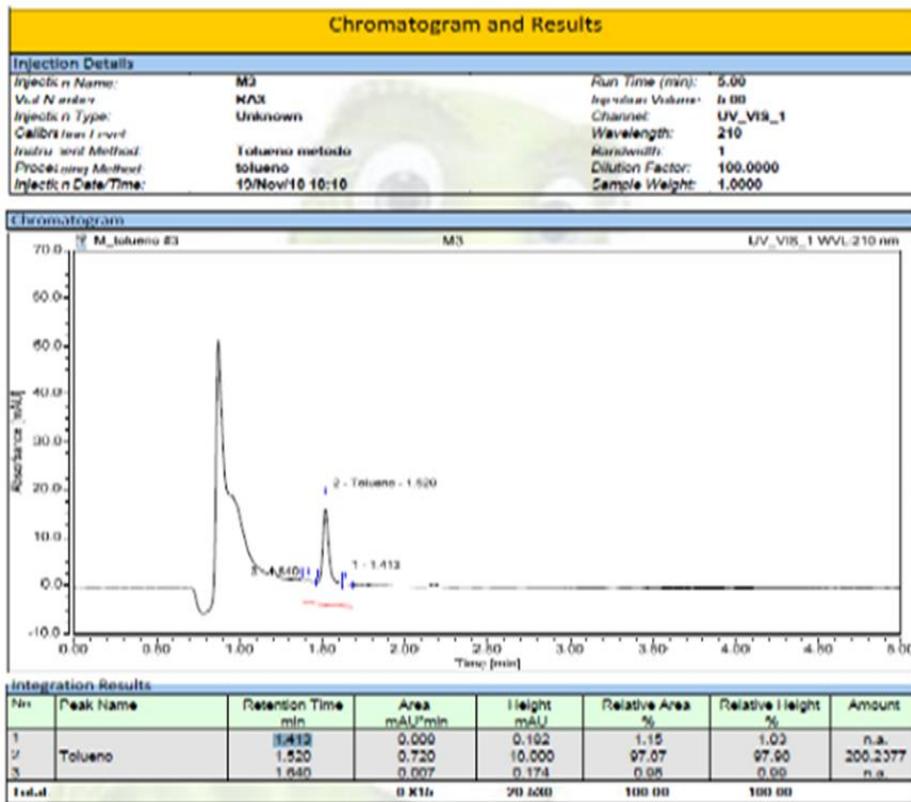
### Muestra control (BLANCO)



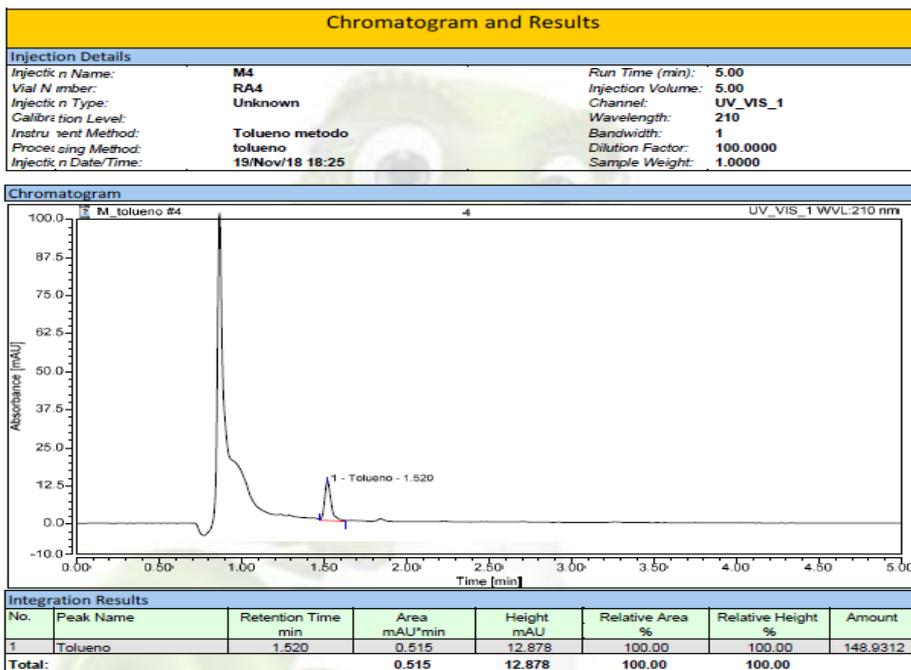
### Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 7 días -replica 1:



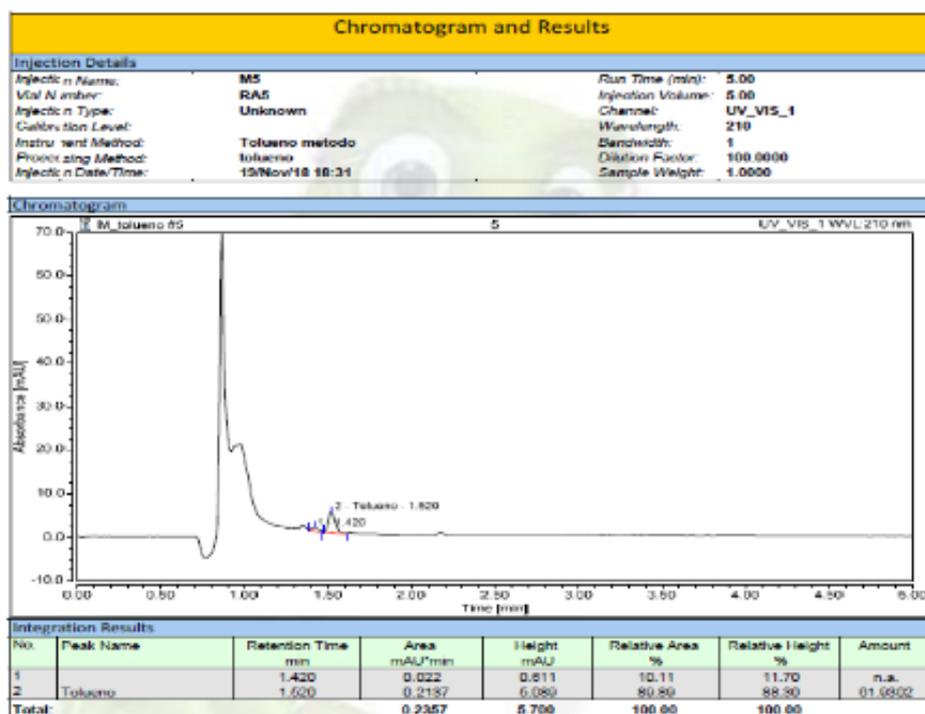
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 7 días -replica 2



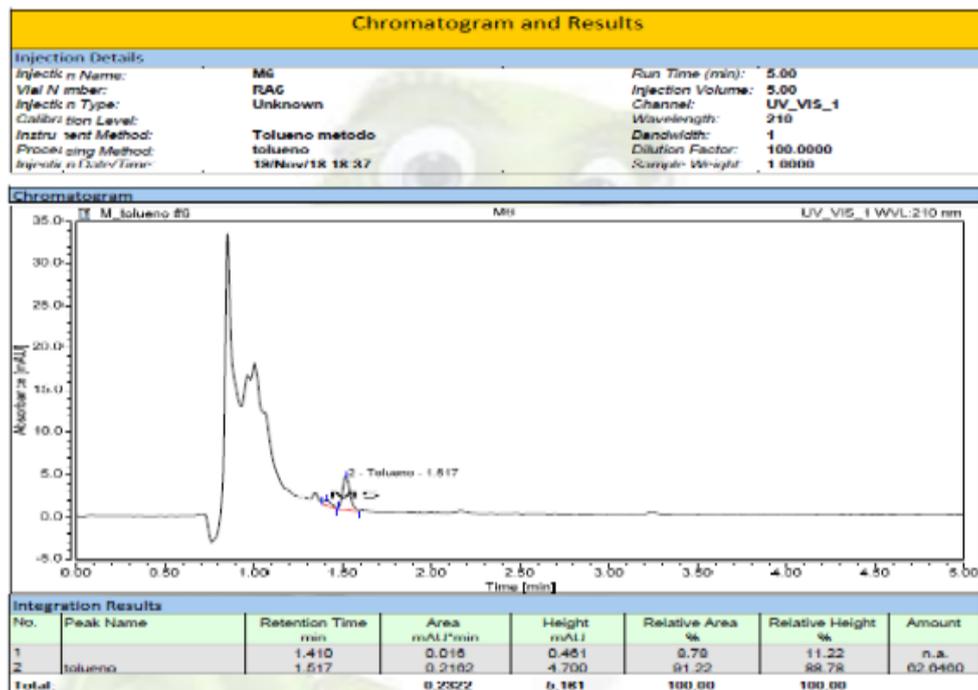
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 7 días -replica 3



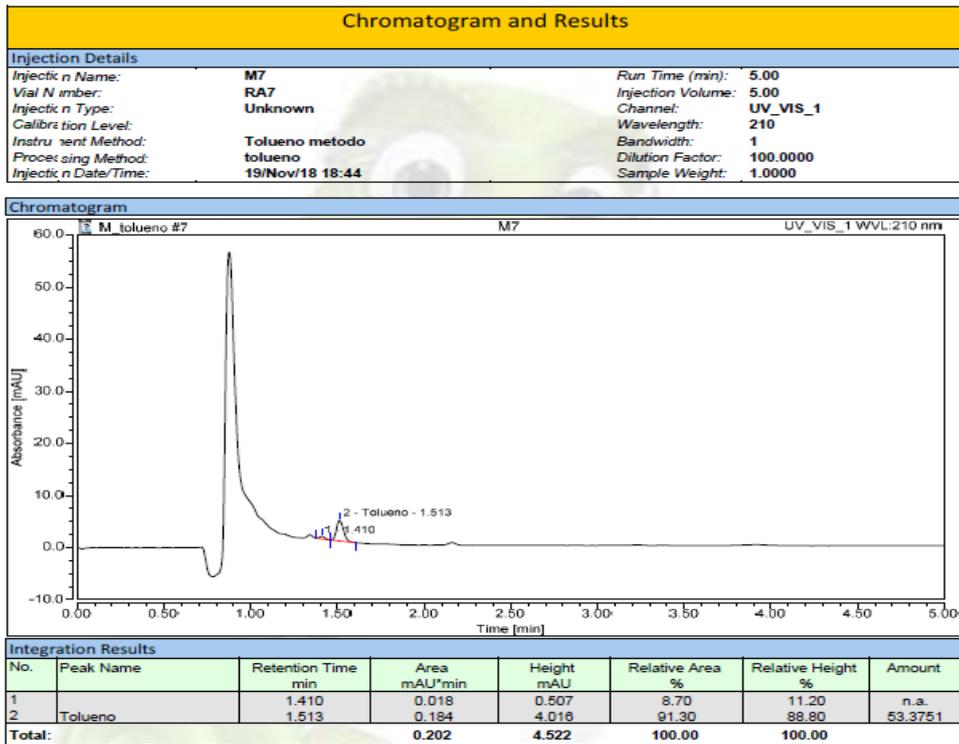
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 7 días -replica 1



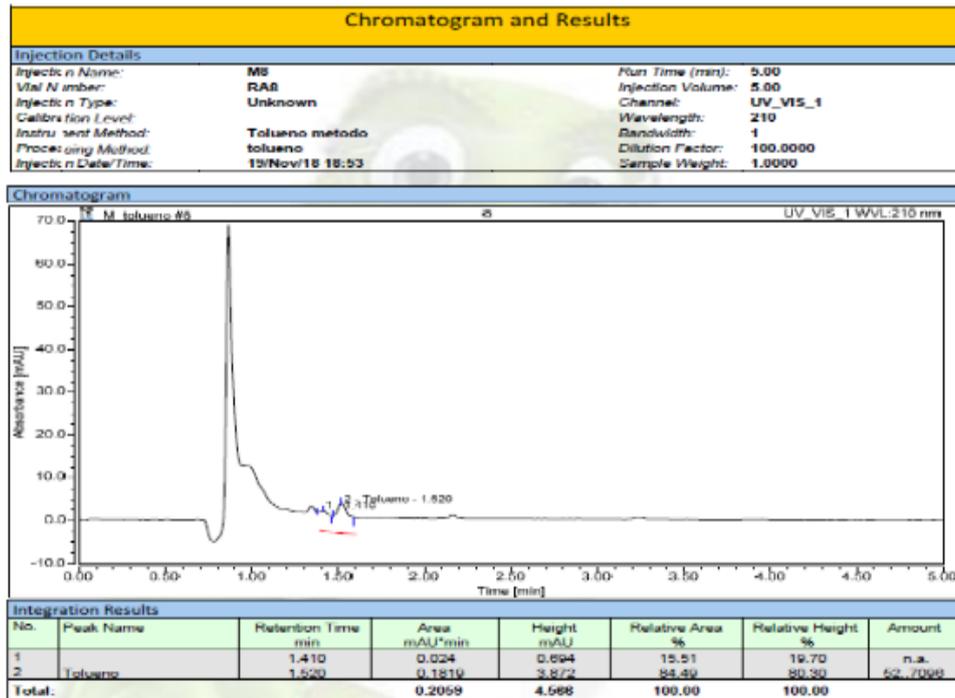
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 7 días -replica 2



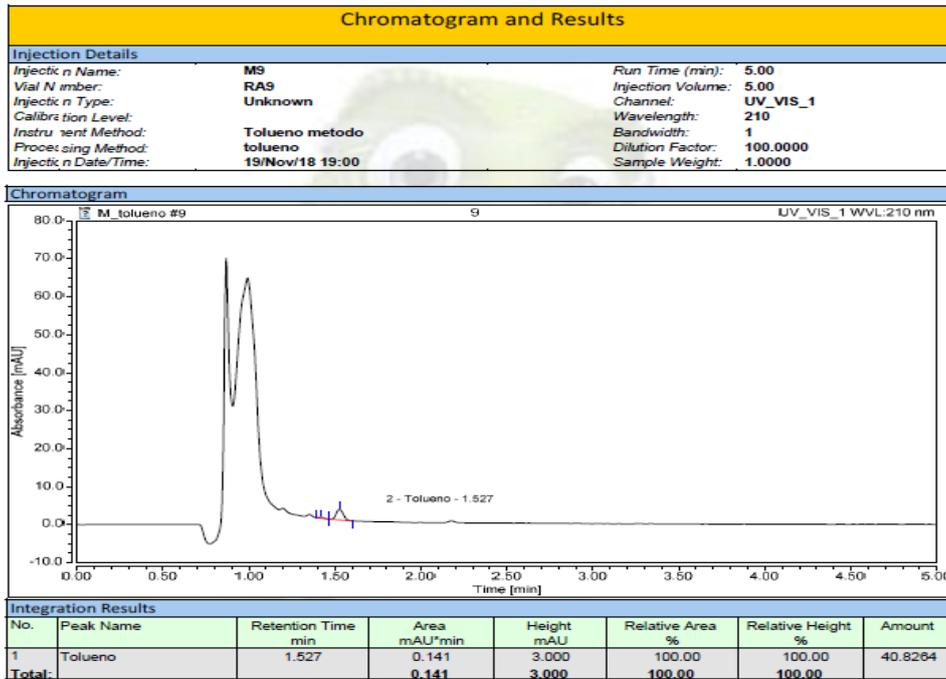
### Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 7 días -replica 3



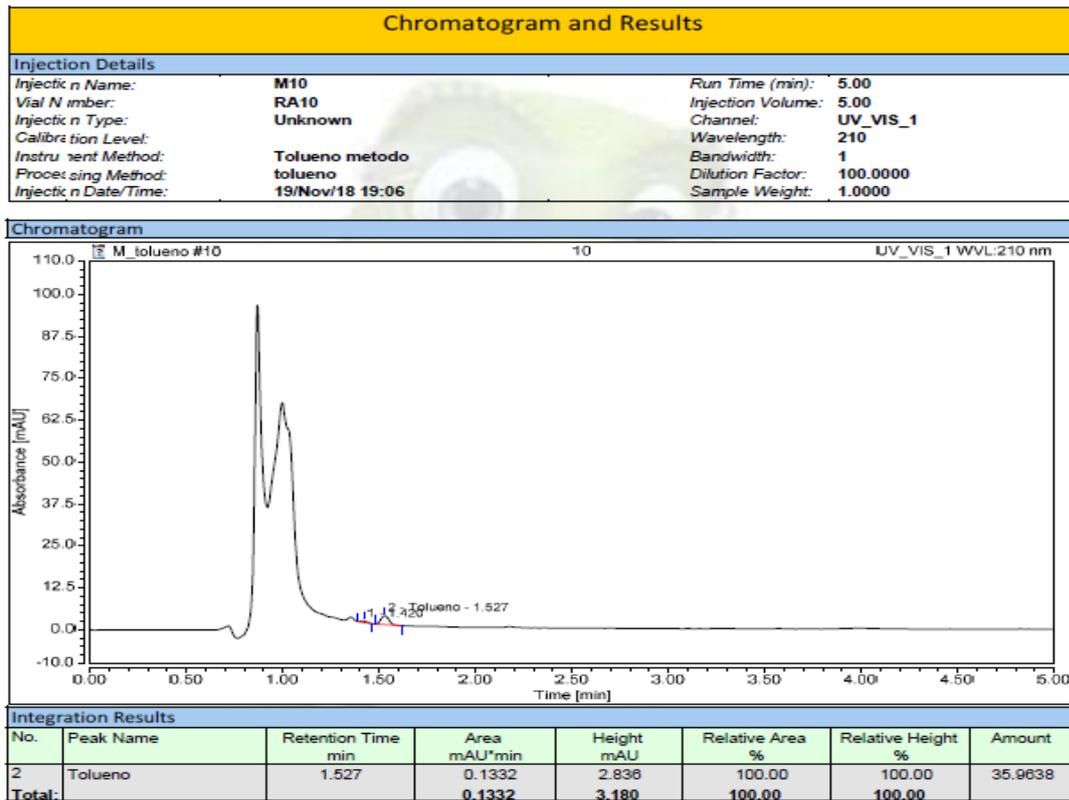
### Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 7 días -replica 1



## Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 7 días -replica 2



## Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 7 días -replica 3



## Determinación de Peso -Muestras a los 14 días

Replica	[ ] de <i>P.aeuriginosa</i>	Peso de capacho(inicial)	Peso de capacho(final)	Peso Neto
Matraz 1	10 <sup>8</sup>	0.130100	0.135100	0.005000
Matraz 2	10 <sup>8</sup>	0.129200	0.134300	0.005100
Matraz 3	10 <sup>8</sup>	0.133100	0.137500	0.004400
Matraz 1	10 <sup>6</sup>	0.144600	0.147200	0.002600
Matraz 2	10 <sup>6</sup>	0.125500	0.128300	0.002800
Matraz 3	10 <sup>6</sup>	0.129800	0.132200	0.002400
Matraz 1	10 <sup>4</sup>	0.131400	0.132300	0.000900
Matraz 2	10 <sup>4</sup>	0.130100	0.131100	0.001000
Matraz 3	10 <sup>4</sup>	0.127800	0.128100	0.000300
Control	Blanco	0.129000	0.129200	0.000200

**Tabla 7.-** Se puede observar en la primera columna el número de réplicas en la segunda columna muestra las concentraciones de *Pseudomonas aeruginosa*, en la tercera columna indica el peso del capacho inicial en (gr) en la cuarta columna muestra el peso del capacho final en (gr) luego de a ver agregado las muestras de *Pseudomonas aeruginosa*, en la última columna se observa el peso neto de *P. aeruginosa* presente en cada concentración respecto a la réplica.

10 <sup>8</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.005000	0.005100	0.004400

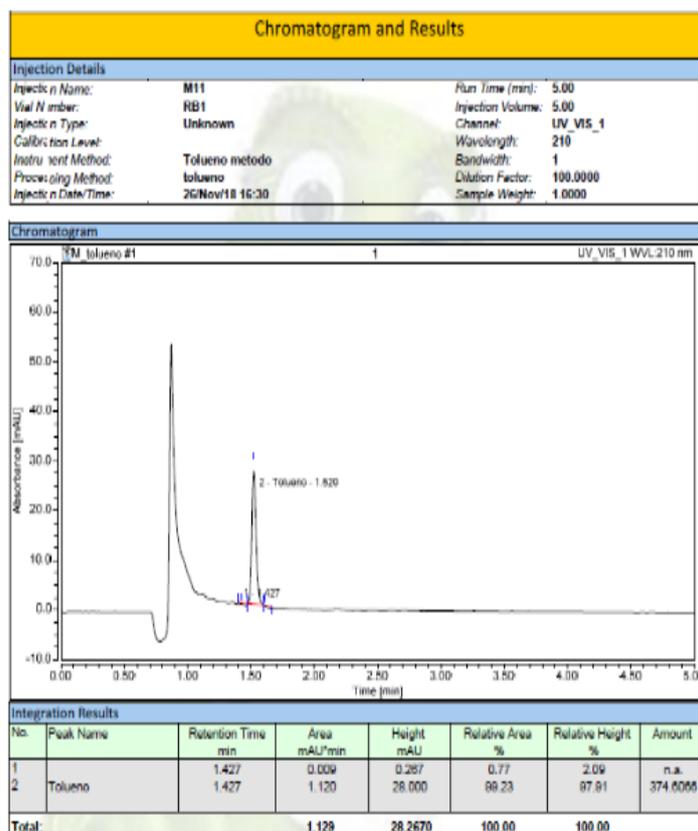
10 <sup>6</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.002600	0.002800	0.002400

10 <sup>4</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.000900	0.001000	0.000300

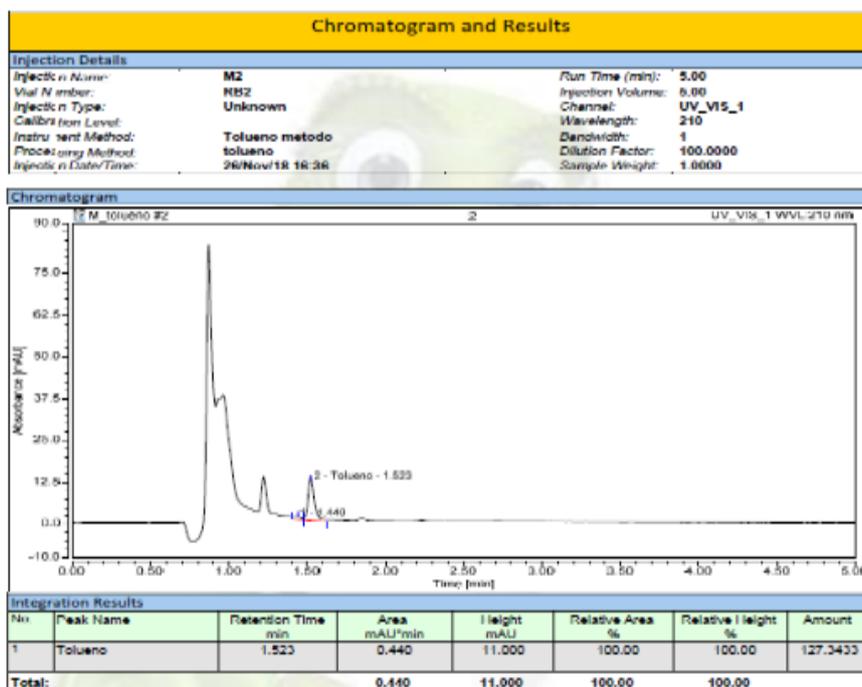
Control	Matraz 1
	0.00000

**Resumen del Peso Seco de las muestras a los 14 días.**

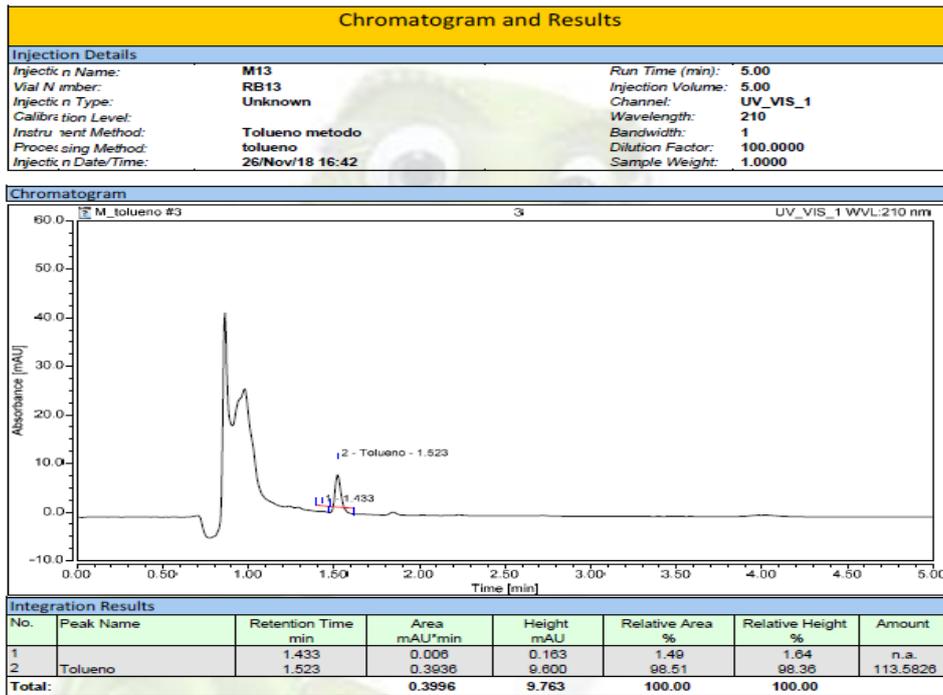
## Muestra control (BLANCO) a los 14 días



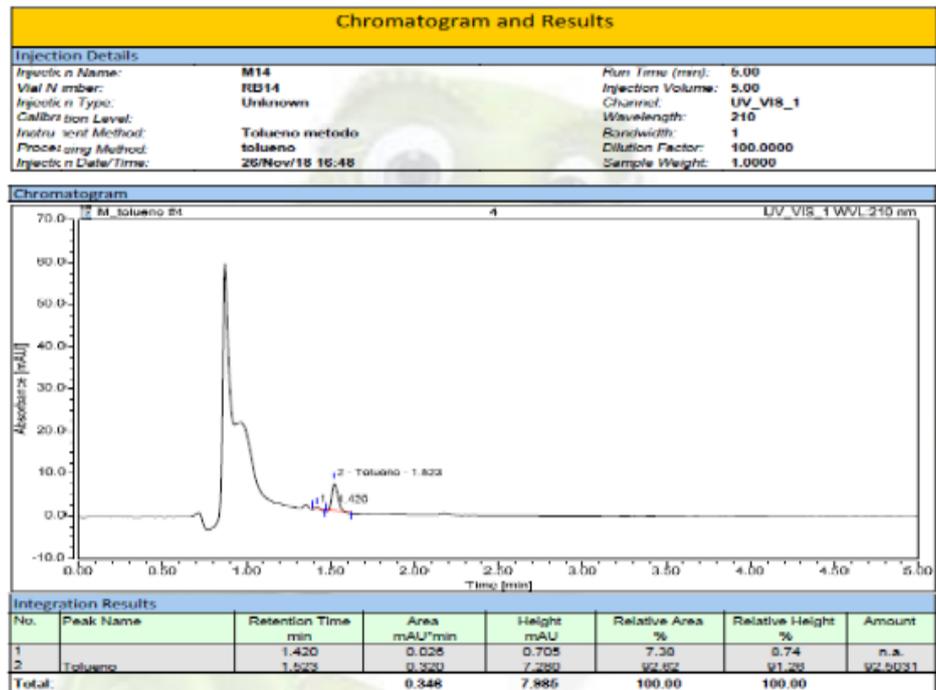
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 14 días replica 1



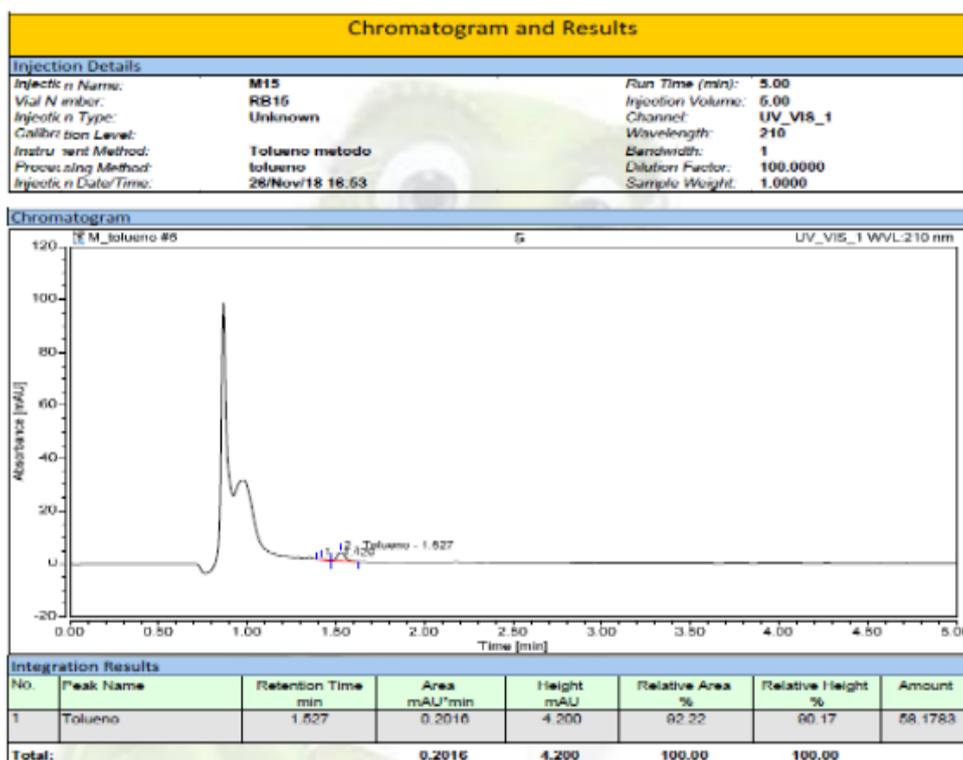
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 14 días -replica 2



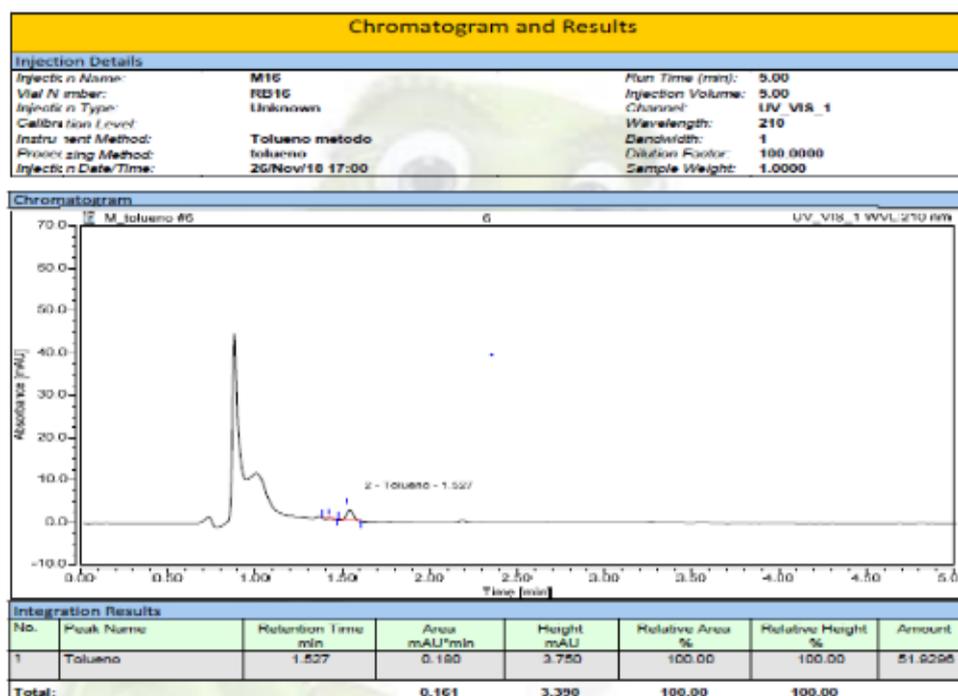
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 14 días -replica 3



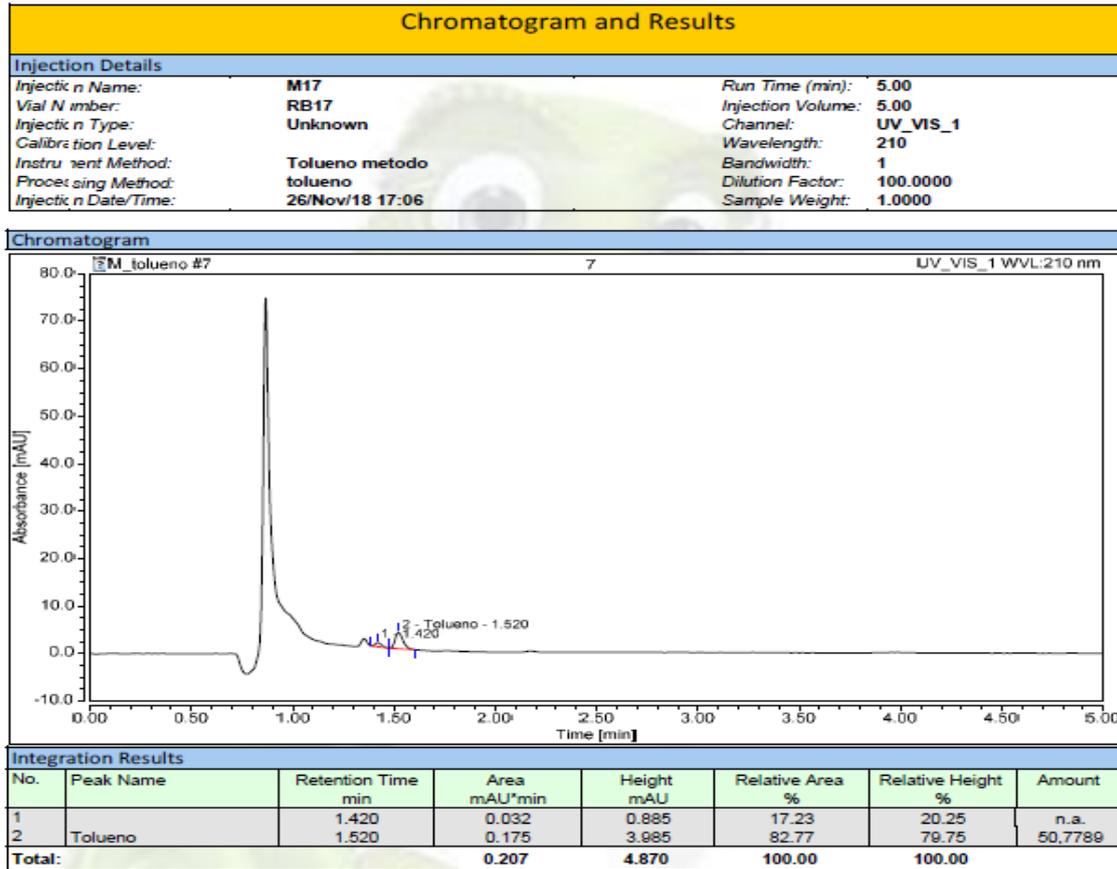
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 14 días -replica 1



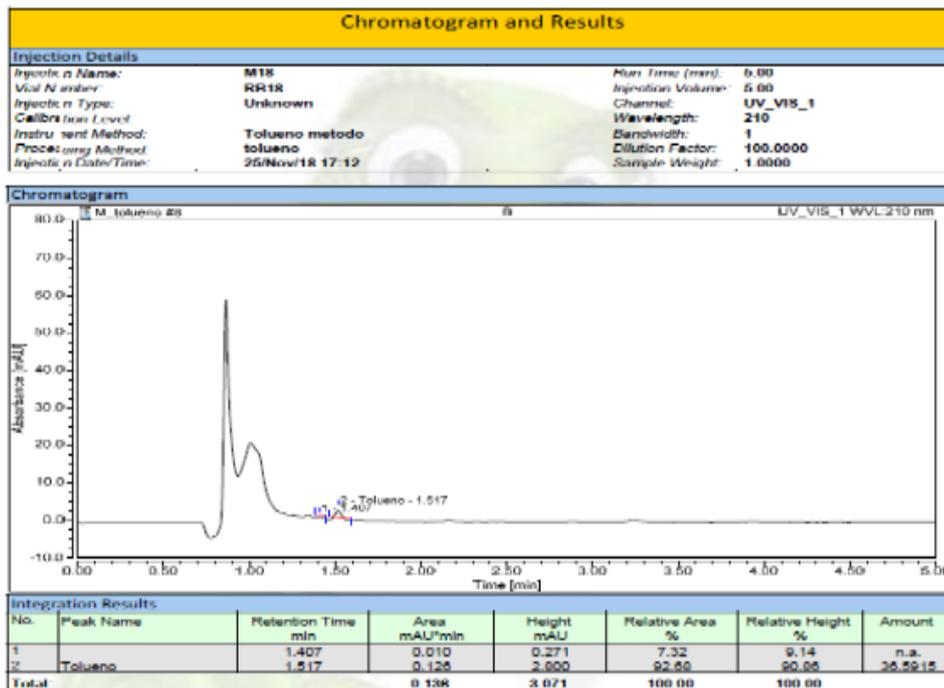
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 14 días -replica 2



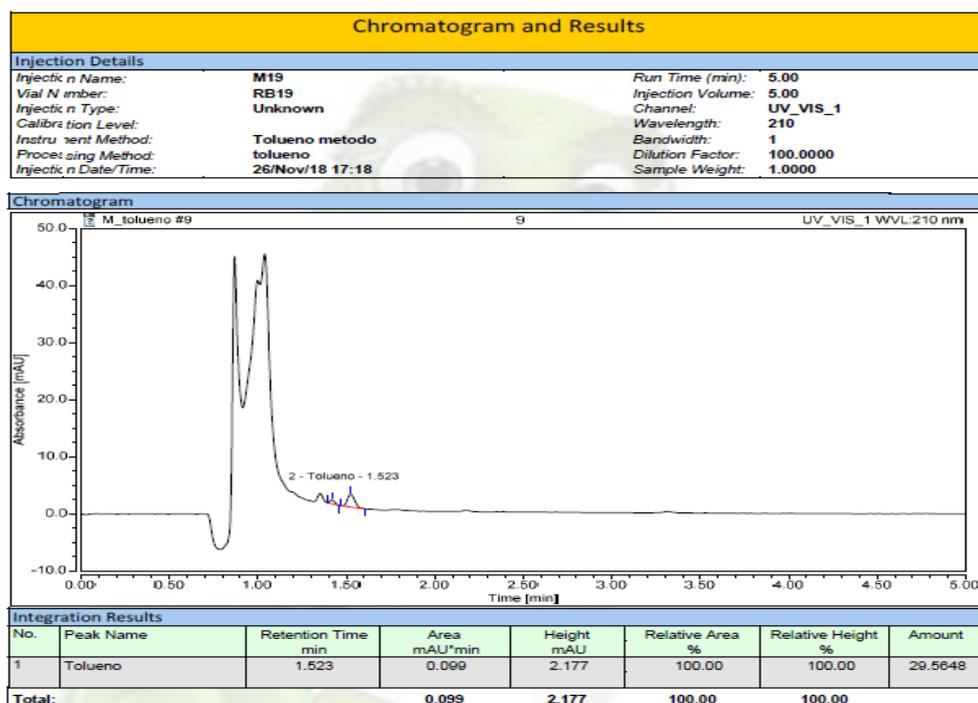
**Muestra de la concentración de  $30 \times 10^6$  a los 14 días -replica 3**



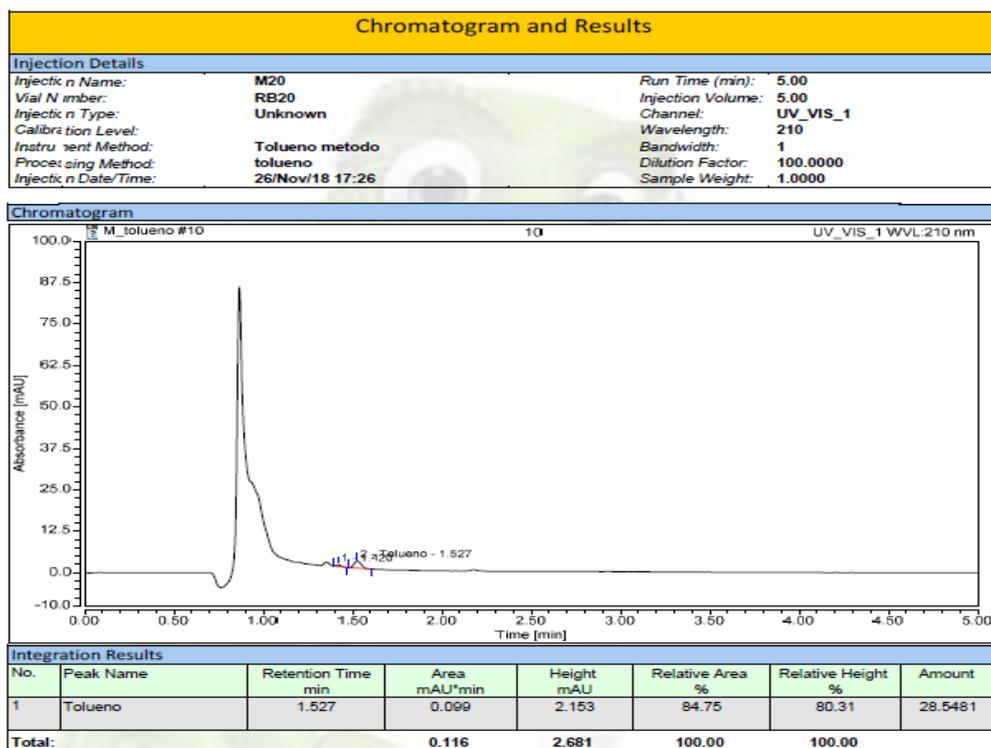
**Muestra de la concentración de  $30 \times 10^8$  a los 14 días -replica 1**



## Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 14 días -replica 2



## Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 14 días -replica 3



### Determinación de Peso -Muestras a los 21 días

Replica	[ ] de P. aeruginosa	Peso de capacho(inicial)	Peso de capacho(final)	Peso Neto
Matraz 1	10 <sup>8</sup>	0.135000	0.142400	0.007400
Matraz 2	10 <sup>8</sup>	0.129000	0.136500	0.007500
Matraz 3	10 <sup>8</sup>	0.138100	0.145100	0.007000
Matraz 1	10 <sup>6</sup>	0.132000	0.135300	0.003300
Matraz 2	10 <sup>6</sup>	0.130000	0.133600	0.003600
Matraz 3	10 <sup>6</sup>	0.127900	0.130900	0.003000
Matraz 1	10 <sup>4</sup>	0.130800	0.133600	0.002800
Matraz 2	10 <sup>4</sup>	0.134900	0.138500	0.003600
Matraz 3	10 <sup>4</sup>	0.121700	0.124300	0.002600
Control	Blanco	0.122000	0.122100	0.000100

Se puede observar en la primera columna el número de réplicas en la segunda columna muestra las concentraciones de *Pseudomonas aeruginosa*, en la tercera columna indica el peso del capacho inicial en (gr) en la cuarta columna muestra el peso del capacho final en (gr) luego de a ver agregado las muestras de *Pseudomonas aeruginosa*, en la última columna se observa el peso neto de *P. aeruginosa* presente en cada concentración respecto a la réplica,

10 <sup>8</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.007400	0.007500	0.007000

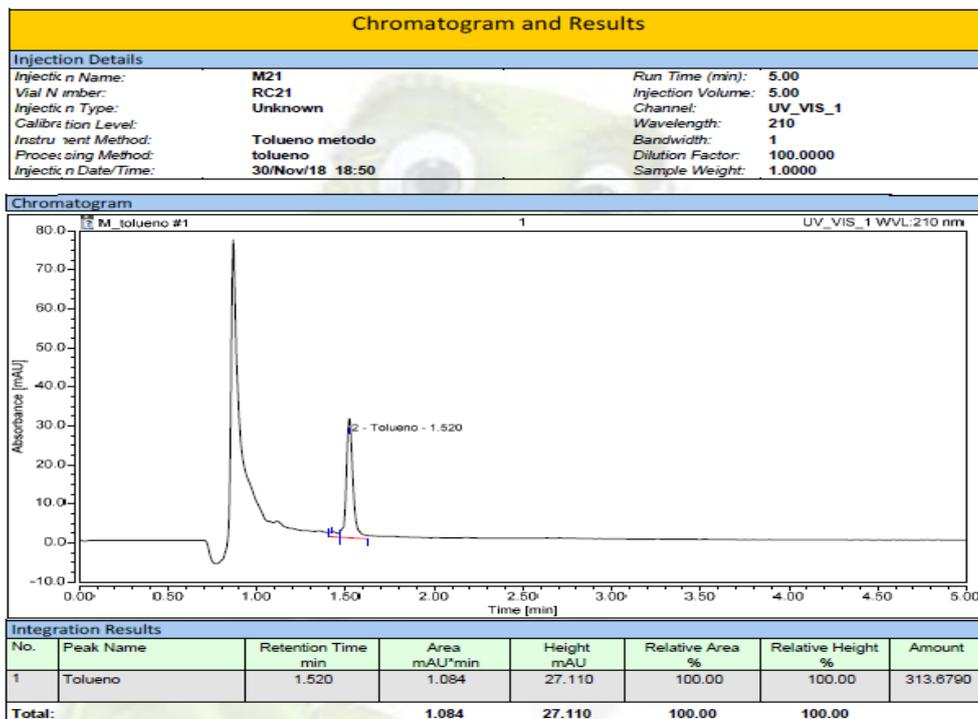
10 <sup>6</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.003300	0.003600	0.003000

10 <sup>4</sup>	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
	0.002800	0.003600	0.002600

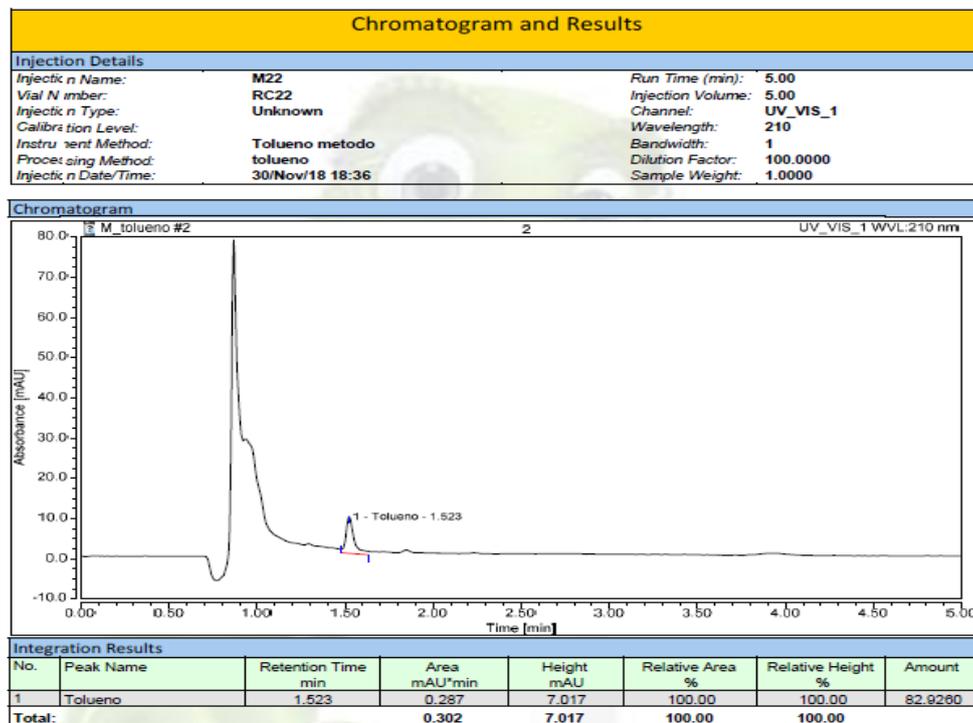
Control	Matraz 1
	0.000000

**Resumen del Peso Seco de las muestras a los 21 días.**

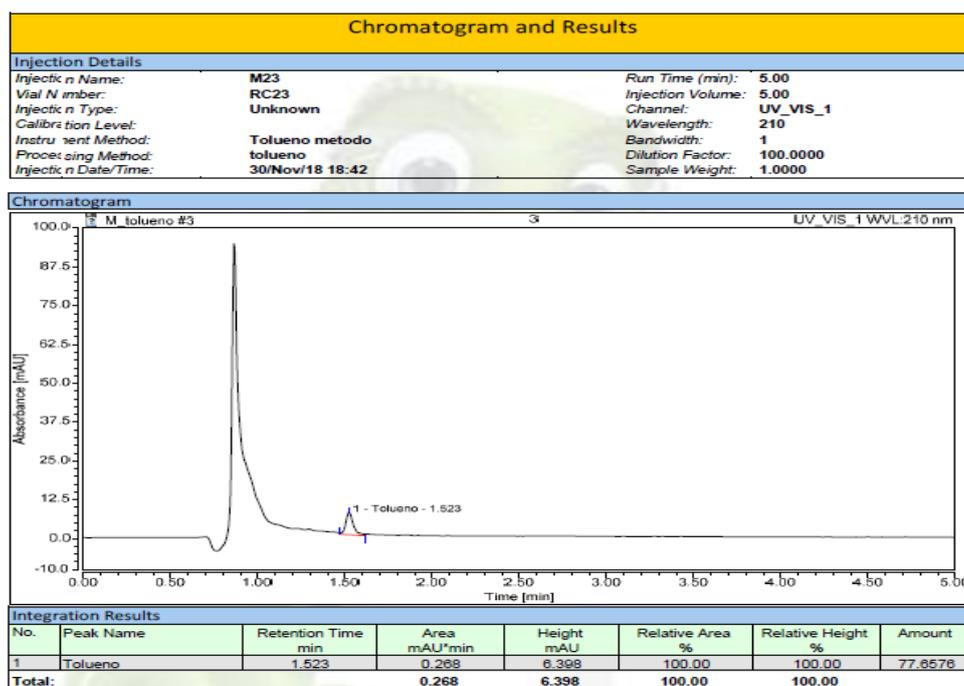
## Muestra control (BLANCO) a los 21 días



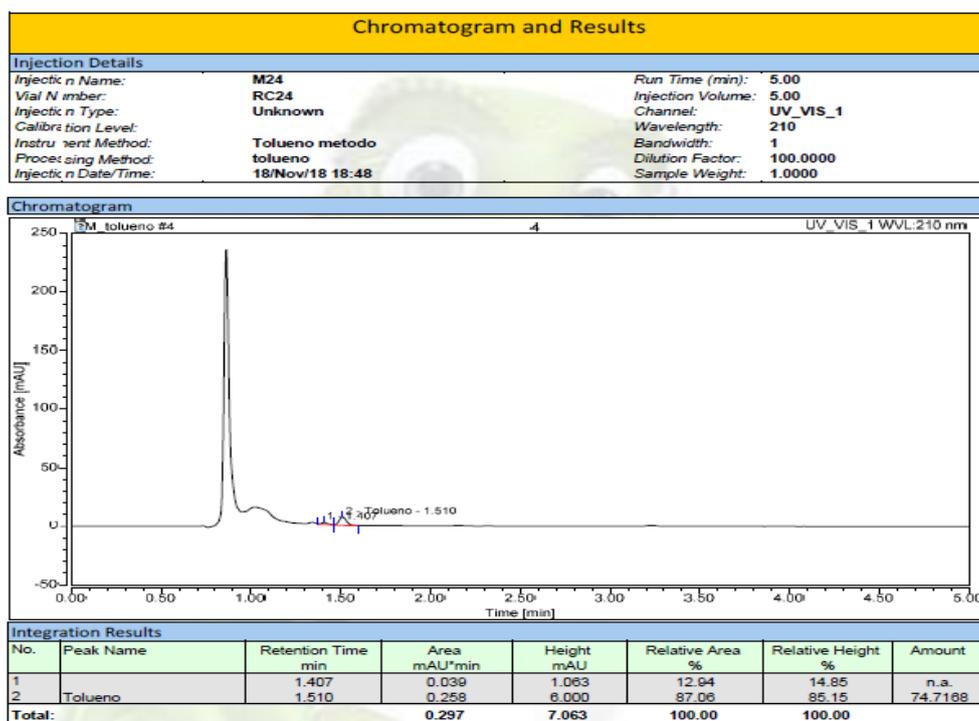
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 21 días -replica 1



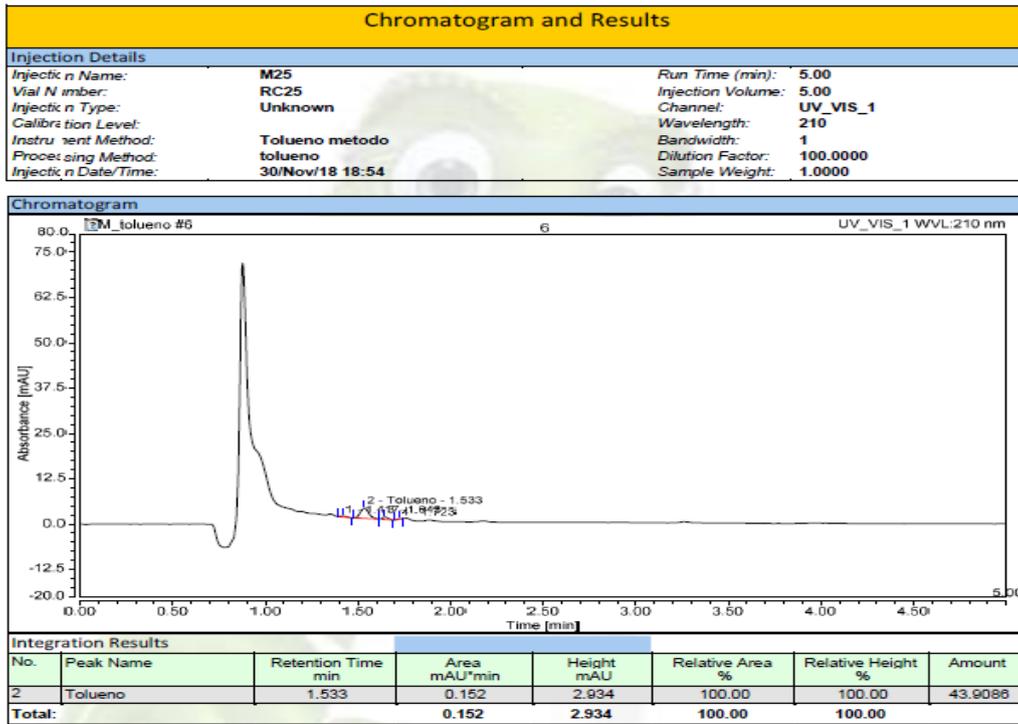
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 21 días -replica 2



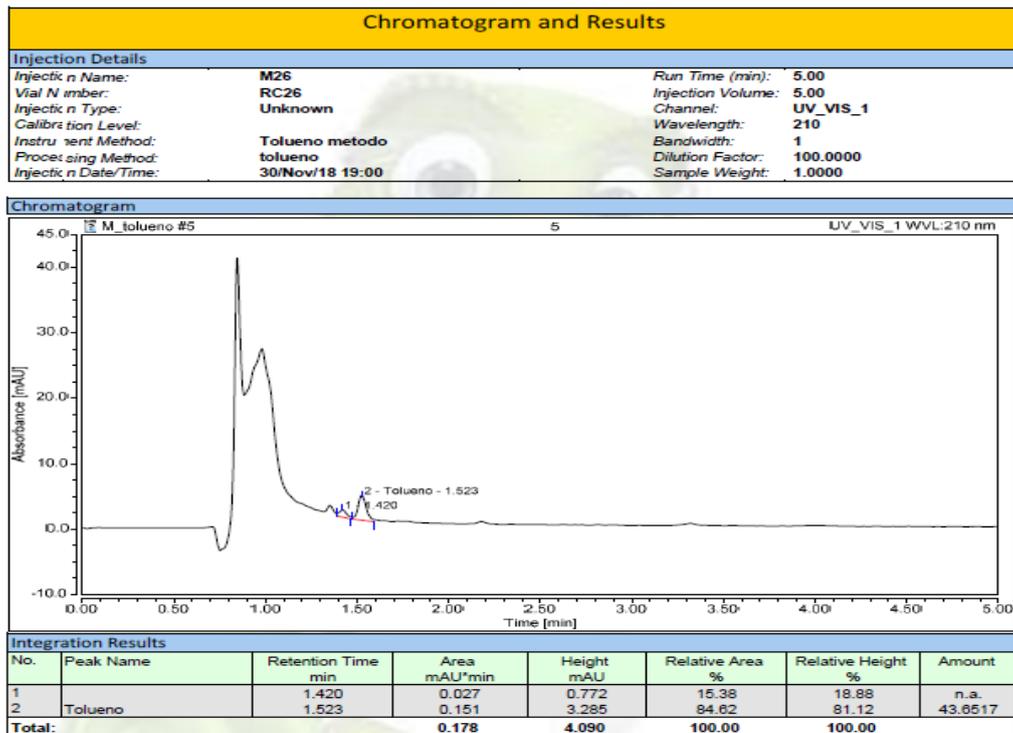
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^4$ a los 21 días -replica 3



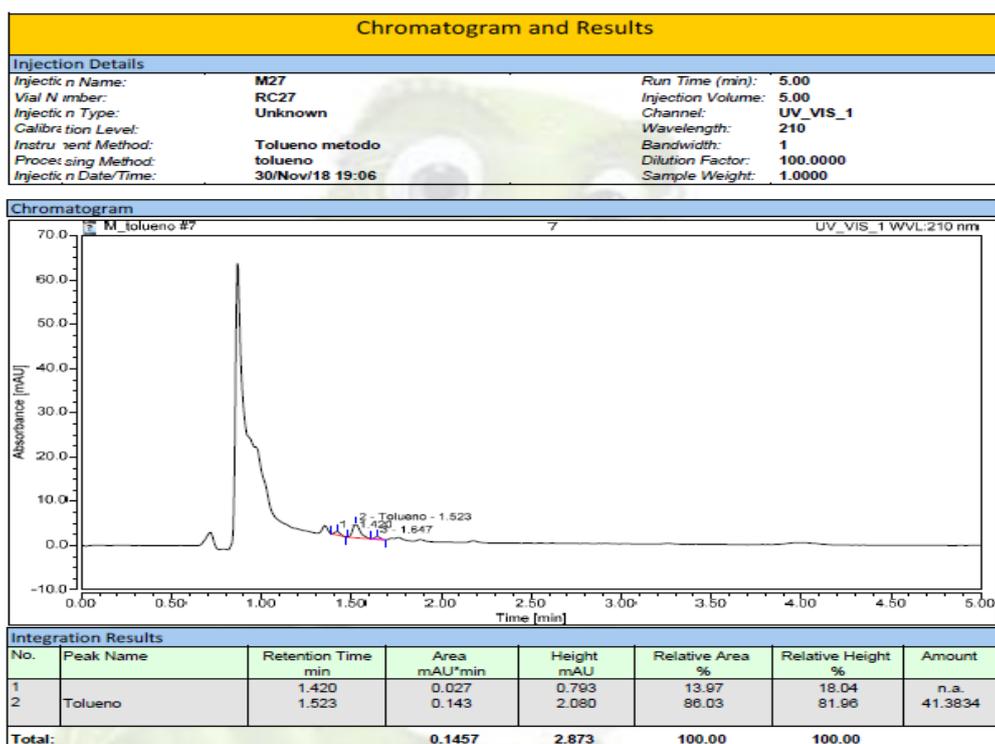
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 21 días -replica 1



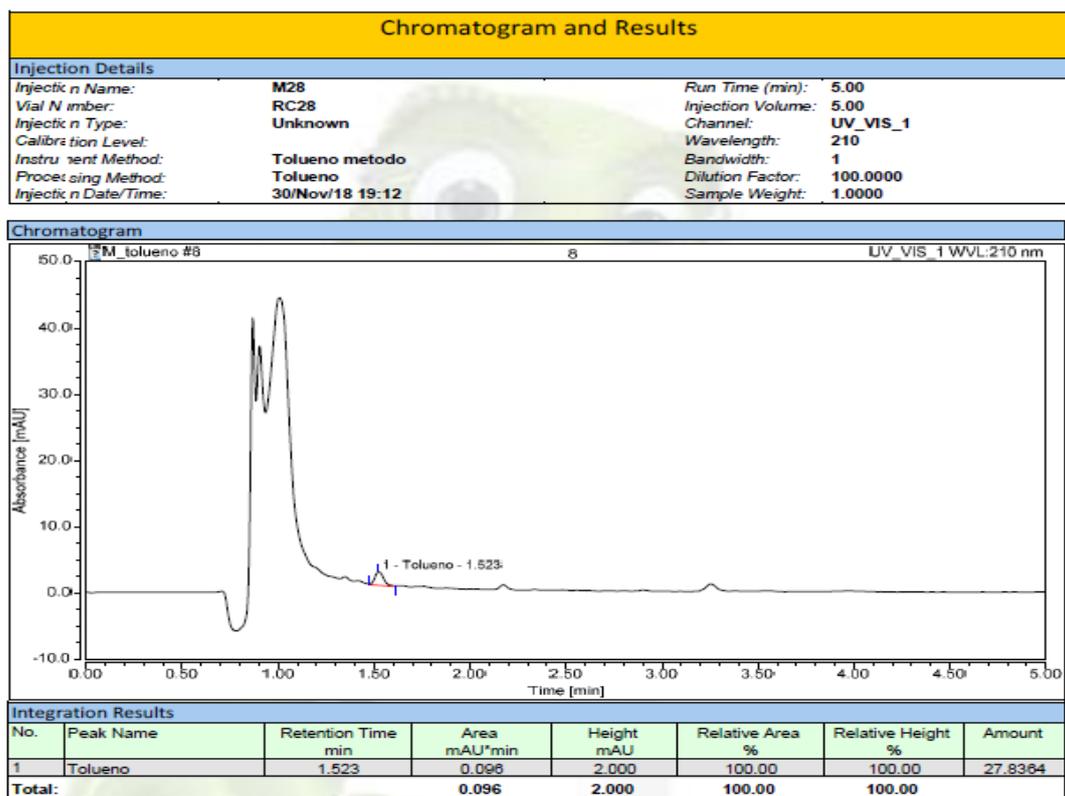
## Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 21 días -replica 2



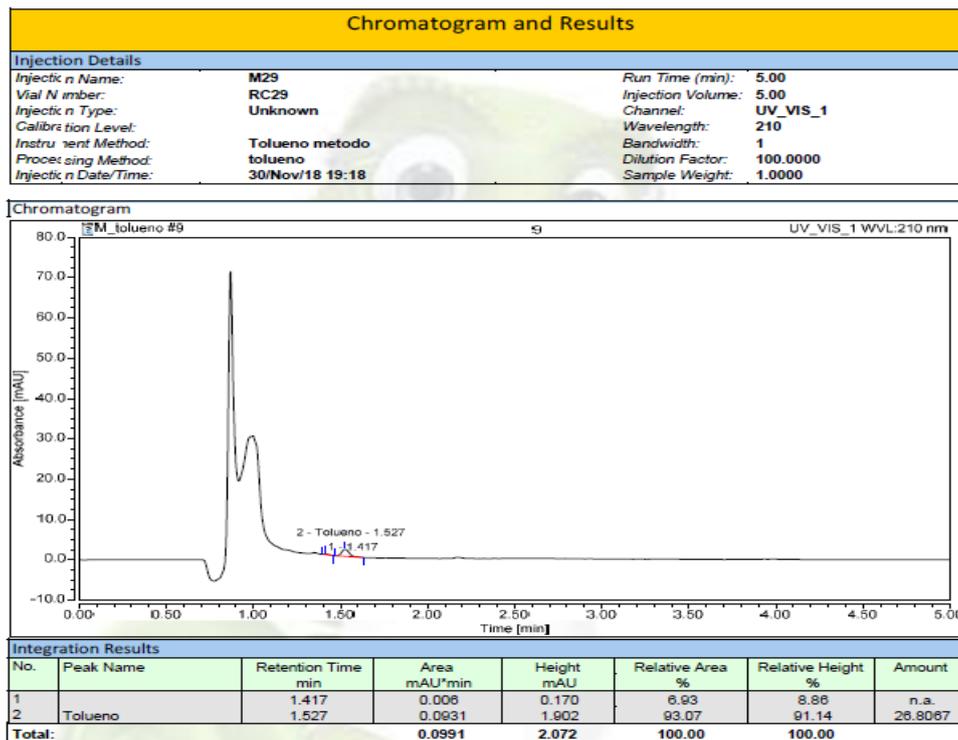
### Muestra de la concentración de $30 \times 10^6$ a los 21 días -replica 3



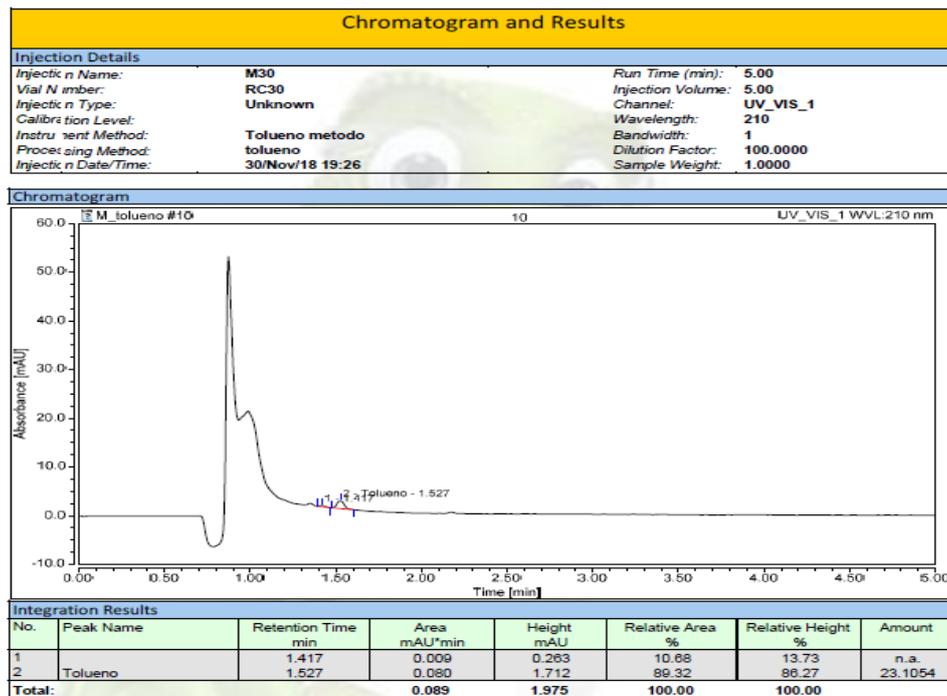
### Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 21 días -replica 1



## Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 21 días -replica 2



## Muestra de la concentración de $30 \times 10^8$ a los 21 días -replica 3





## DECLARACION JURADA DE AUTORÍA

Yo, Sharon Fiorela Rosales Lecca

Facultad:	Ciencias	<input checked="" type="checkbox"/>	Educación	<input type="checkbox"/>	Ingeniería	<input type="checkbox"/>
Escuela Profesional:	Biotecnología					
Departamento Académico:	Biología, Microbiología y Biotecnología					
Escuela de Posgrado	Maestría	<input type="checkbox"/>		Doctorado	<input type="checkbox"/>	
Programa:						
De la Universidad Nacional del Santa; Declaro que el trabajo de investigación intitulado:						
"BIODEGRADACIÓN DE TOLUENO POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> EN SUELOS CONTAMINADOS CON DERRAMES DE PETRÓLEO. IQUITOS"						
presentado en 131... folios, para la obtención del Grado académico:					( )	
Título profesional:	(X)		Investigación anual:	( )		
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ He citado todas las fuentes empleadas, no he utilizado otra fuente distinta a las declaradas en el presente trabajo.</li><li>➤ Este trabajo de investigación no ha sido presentado con anterioridad ni completa ni parcialmente para la obtención de grado académico o título profesional.</li><li>➤ Comprendo que el trabajo de investigación será público y por lo tanto sujeto a ser revisado electrónicamente para la detección de plagio por el VRIN.</li><li>➤ De encontrarse uso de material intelectual sin el reconocimiento de su fuente o autor, me someto a las sanciones que determinan el proceso disciplinario.</li></ul>						
Nuevo Chimbote, 09 de Marzo de 2023						
Firma:						
Nombres y Apellidos:	Sharon Fiorela Rosales Lecca					
DNI:	45780921					

NOTA: Esta Declaración Jurada simple indicando que su investigación es un trabajo inédito, no exime a tesisistas e investigadores, que no bien se retome el servicio con el software antiplagio, ésta tendrá que ser aplicado antes que el informe final sea publicado en el Repositorio Institucional Digital UNS.



## DECLARACION JURADA DE AUTORÍA

Yo, *Saul Yovani Domínguez Vega*

Facultad:	Ciencias <input checked="" type="checkbox"/>	Educación	Ingeniería
Escuela Profesional:	<i>Biotecnología</i>		
Departamento Académico:	<i>Microbiología, Biología y Biotecnología</i>		
Escuela de Posgrado	Maestría		Doctorado

Programa:

De la Universidad Nacional del Santa; Declaro que el trabajo de investigación intitulado:

*"BIODEGRADACIÓN DE TOWEND POR Pseudomonas aeruginosa EN SUELOS CONTAMINADOS CON DERRAMES DE PETRÓLEO. JAVITOS"*

presentado en *131* folios, para la obtención del Grado académico: ( )

Título profesional: (X) Investigación anual: ( )

- He citado todas las fuentes empleadas, no he utilizado otra fuente distinta a las declaradas en el presente trabajo.
- Este trabajo de investigación no ha sido presentado con anterioridad ni completa ni parcialmente para la obtención de grado académico o título profesional.
- Comprendo que el trabajo de investigación será público y por lo tanto sujeto a ser revisado electrónicamente para la detección de plagio por el VRIN
- De encontrarse uso de material intelectual sin el reconocimiento de su fuente o autor, me someto a las sanciones que determinan el proceso disciplinario.

Nuevo Chimbote, *09* de *Marzo* de 20 *23*

Firma:

Nombres y Apellidos *Saul Yovani Domínguez Vega*

DNI *76 20 8362*

NOTA: Esta Declaración Jurada simple indicando que su investigación es un trabajo inédito, no exime a tesis y a investigadores, que no bien se retome el servicio con el software antiplagio, ésta tendrá que ser aplicado antes que el informe final sea publicado en el Repositorio Institucional Digital UNS.