

UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRARIA



Evaluación del potencial degradador de hidrocarburos por bacterias
del género *Pseudomonas* aisladas de suelos agrícolas de Casa
Blanca, Pachacámac

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AMBIENTAL**

AUTORA

Paola Norca Ludeña Mendez

ASESORA

Heidi Isabel Sánchez Torres

Lima, Perú

2020

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

ACTA N° 014.- 2019/UCSS/FIA

Siendo las 09:00 am, del día 12 de setiembre de 2019, en el Auditorio del Local Central de la Sede Lima - Universidad Católica Sedes Sapientiae, el Jurado de Tesis, integrado por:

- | | |
|---|-----------------|
| 1. Dr. Francisco Alejandro Alcántara Boza | Presidente |
| 2. Mg. Narda Stella Fajardo Vidal | Primer Miembro |
| 3. Ing. Julián Alberto Álvarez Paredes | Segundo Miembro |
| 4. Mg. Heidi Isabel Sánchez Torres | Asesora |

Se reunieron para la sustentación de la tesis titulada: "EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DEGRADADOR DE HIDROCARBUROS POR BACTERIAS DEL GÉNERO *PSEUDOMONAS* AISLADAS DE SUELOS AGRÍCOLAS DE CASA BLANCA, PACHACÁMAC", que presenta la bachiller en Ciencias Ambientales, la Srta. **Paola Norka Ludeña Mendez** cumpliendo así con los requerimientos exigidos por el reglamento para la modalidad de titulación; la presentación y sustentación de un trabajo de investigación original, para obtener el Título Profesional de **Ingeniero Ambiental**.


Terminada la sustentación, el Jurado luego de deliberar acuerda:

APROBAR

DESAPROBAR

La tesis, con el calificativo de **Bueno** y eleva la presente Acta al Decanato de la Facultad de Ingeniería Agraria, a fin de que se declare EXPEDITA para conferírle el TÍTULO de INGENIERO AMBIENTAL.


Firmado en Lima, 12 de setiembre de 2019.



Dr. Francisco Alejandro Alcántara Boza
PRESIDENTE



Mg. Narda Stella Fajardo Vidal
1° MIEMBRO



Ing. Julián Alberto Álvarez Paredes
2° MIEMBRO



Mg. Heidi Isabel Sánchez Torres
ASESORA

DEDICATORIA

A Dios nuestro creador, por guiarnos y estar siempre en cada paso de nuestra vida.

A mis padres Luis Ludeña Paredes y Norca Mendez Angeles, por haberme guiado con esfuerzo, apoyo e inteligencia y amor todos estos años, tratando siempre de ser el orgullo de ustedes, los amo (su chuchuca). A mi bebe que estuvo acompañándome en todo momento principalmente en cada desvelada que tuve en la realización de la presente investigación y que ahora forma uno más de mis angelitos en el cielo.

A mi abuelo, mi papimachi que se convirtió en un angelito en el cielo y su deseo de siempre que todos sus nietos sobresalieran en lo profesional, sé que desde arriba estarás orgulloso de mí, tu paula como siempre me decías.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, Mg. Heidi Sánchez Torres por su disposición, dedicación en la asesoría del presente trabajo y apoyo invaluable como asesora y amiga. De igual manera, al Blgo. Armando Chiella Salazar, por su constante ayuda y sugerencias en el desarrollo de la presente investigación.

A mi amiga Ana Lucia Ramos Torre, amiga desde la universidad que siempre estuvo conmigo como una hermana apoyándome siempre en las buenas y en las malas; por las grandes cosas que vivimos, anécdotas y siempre levantándonos unas a otras en el ámbito profesional y personal.

A Kenji Takahashi, que se convirtió en uno de mis grandes amigos en tan poco tiempo por las grandes anécdotas, emociones, ocurrencias y apoyo constante en el laboratorio y ejecución de la Tesis.

A mi abuela, mi mamá por siempre creer en mí, por su apoyo, sabios consejos y lecciones de vida, de igual manera a mi ahijada Loana, la personita más chiquita que me enseñó a luchar y aferrarse por lo que uno quiere, a seguir adelante desde el momento que estuvo en la barriguita.

Y a todas las personas que han contribuido a la culminación del trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice general	v
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	x
Índice de apéndices.....	xii
Resumen	xiv
Abstract.....	xv
Introducción.....	1
Objetivos.....	3
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1. Antecedentes	4
1.2. Bases teóricas especializadas	11
1.2.1. <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “frijol”	11
1.2.2. <i>Manihot esculenta</i> Crantz “Yuca”	15
1.2.3. <i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancr. “Arracacha”	19
1.2.4. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	22
1.2.5. Crudo de petróleo	23
1.2.6. Hidrocarburos	23
1.2.7. Composición del crudo de petróleo.....	24
1.2.8. Composición por familias de hidrocarburos	25
1.2.9. Tipos de biorremediación	26
1.2.10. Fundamentación bioquímica de la biodegradación	29
1.2.11. Principales factores importantes que condicionan la biodegradación microbiana de un suelo.....	29
1.2.12. Destino ambiental de hidrocarburos.....	31
1.2.13. Biodegradación de hidrocarburos por microorganismos del suelo	31
1.2.14. Microorganismos degradadores de hidrocarburos	33
1.2.15. <i>Pseudomonas sp.</i>	34
1.2.16. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	36
1.2.17. Vías de degradación de los hidratos de carbono	36
1.2.18. Capacidad biosurfactante de microorganismos	38
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	40
2.1. Diseño de la investigación	40
2.2. Lugar y fecha.....	40
2.3. Materiales.....	42

2.3.1.	Material Biológico.....	42
2.3.2.	Medio de Cultivo.....	42
2.3.3.	Reactivos	42
2.3.4.	Equipos.....	42
2.4.	Descripción de la investigación	43
2.4.1.	Recolección de muestras de suelo y raíces de la planta (frijol, yuca y arracacha).....	44
2.4.2.	Recolección de la muestra de crudo de petróleo	45
2.4.3.	Aislamiento primario de la cepa de bacterias del género <i>Pseudomonas fluorescens</i>	46
2.4.4.	Aislamiento secundario (purificación de bacterias)	47
2.4.5.	Caracterización de bacterias del género <i>Pseudomonas</i> mediante métodos microbiológicos y bioquímicos convencionales	48
2.4.6.	Selección de bacterias del género <i>Pseudomonas</i> con potencial degradador de hidrocarburos.....	51
2.4.7.	Evaluación de la capacidad emulsificante de las cepas seleccionadas con potencial degradador de hidrocarburos.	52
2.4.8.	Obtención del inóculo de las cepas seleccionadas del género <i>Pseudomonas fluorescens</i> por bioaumentación.....	53
2.4.9.	Evaluación de las cepas seleccionadas pertenecientes al género <i>Pseudomonas</i> en los tratamientos con crudo de petróleo al 3 % y 5 % durante 30 y 60 días.....	54
2.5.	Tratamientos experimentales	55
2.6.	Unidades experimentales	56
2.7.	Identificación de variables y su mensuración	57
2.7.1.	Medición del potencial de hidrógeno (pH) para cada tratamiento	57
2.7.2.	Para la medición de NPK	58
2.7.3.	Recuento de bacterias Oleofílicas.	61
2.7.4.	Evaluación del porcentaje de reducción de crudo de petróleo al 3 % y 5 % en los tratamientos a los 30 y 60 días.....	62
2.8.	Diseño estadístico del experimento.....	63
2.9.	Análisis estadístico de datos	64
CAPÍTULO III: RESULTADOS		65
3.1.	Caracterización microbiológica y bioquímica de cepas nativas del género <i>Pseudomonas</i> a partir de la rizósfera de plantaciones de “frijol” (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>), “yuca” (<i>Manihot esculenta Crantz</i>) y “arracacha” (<i>Arracacia xanthorrhiza Bancr.</i>).....	65
3.2.	Evaluación de la capacidad emulsificante (Espectrofotometría UV-Vis) de las cepas seleccionadas con potencial degradador de hidrocarburos	68
3.3.	Resultados de la evaluación de las variables implicadas en el proceso de biorremediación del crudo de petróleo	69

CAPÍTULO IV: DISCUSIONES	82
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	88
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
TERMINOLOGÍA	101
APÉNDICES	103

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. <i>Contenido nutricional por cada 100 g de materia seca de frijol</i>	15
Tabla 2. <i>Composición nutricional de la yuca</i>	19
Tabla 3. <i>Valor nutritivo de la arracacha</i>	22
Tabla 4. <i>Composición química de la arracacha</i>	22
Tabla 5. <i>Composición elemental del petróleo</i>	24
Tabla 6. <i>Tipos de reacciones en los procesos de degradación aeróbicos y anaeróbicos</i> ...	29
Tabla 7. <i>Lista de bacterias Gram-negativas aisladas de suelos y sedimentos por su capacidad de utilizar HAPs como única fuente de carbono y energía</i>	33
Tabla 8. <i>Clasificación de las especies del género Pseudomonas</i>	35
Tabla 9. <i>Composición del medio Agar King B</i>	47
Tabla 10. <i>Composición del medio mineral</i>	54
Tabla 11. <i>Descripción de los tratamientos experimentales</i>	55
Tabla 12. <i>Condiciones experimentales para los tratamientos: TC*, TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6</i>	56
Tabla 13. <i>Tratamientos experimentales</i>	64
Tabla 14. <i>Métodos bioquímicos para la identificación de la bacteria Pseudomonas fluorescens</i>	68
Tabla 15. <i>Actividad Emulsificante de las Pseudomonas fluorescens aisladas del frijol, yuca y arracacha</i>	69
Tabla 16. <i>Valores de porcentaje de reducción de crudo de petróleo en los tratamientos (TC*, TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6) a dosis de crudo de petróleo (3 % y 5 %) evaluados a los 30 y 60 días</i>	70
Tabla 17. <i>Valores promedios y desviación estándar (\pm DS) del pH en los tratamientos (TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6) a dosis de crudo de petróleo (3 % y 5 %) evaluados durante 30 y 60 días</i>	72
Tabla 18. <i>Valores promedios y desviación estándar (\pm DS) del nitrógeno en los tratamientos (TC*, TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6) a dosis de crudo de petróleo (3 % y 5 %) evaluados durante los 30 y 60 días</i>	74
Tabla 19. <i>Valores promedios y desviación estándar (\pm DS) del fósforo en los tratamientos (TC*, TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6) a dosis de crudo de petróleo</i>	

<i>(3 % y 5 %) evaluados a los 30 y 60 días.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 20. Valores promedios y desviación estándar (\pm DS) del potasio en los tratamientos (control, T1, T2 y T3) a dosis de crudo de petróleo (3 % y 5 %) evaluados a los 30 y 60 días</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 21. Valores promedios y desviación estándar (\pm DS) del conteo de colonias en los tratamientos (TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6) a dosis de crudo de petróleo (3 % y 5 %) evaluados a los 30 y 60 días.....</i>	<i>80</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Hojas primarias.....	12
<i>Figura 2.</i> Vaina y semilla del frijol.....	12
<i>Figura 3.</i> Raíz de la planta del frijol.....	13
<i>Figura 4 .</i> Fase fenológica de la <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	14
<i>Figura 5.</i> Tallo de la planta de la yuca.	16
<i>Figura 6.</i> Hojas de la planta de la yuca.	17
<i>Figura 7.</i> Componentes del sistema radical de la yuca.	18
<i>Figura 8.</i> Fase fenológica de la yuca.	18
<i>Figura 9.</i> Hojas de la planta arracacha.	20
<i>Figura 10.</i> Raíz de la arracacha.....	21
<i>Figura 11.</i> Estructuras químicas de diferentes compuestos mayoritarios del petróleo..	26
<i>Figura 12.</i> Tipos de biorremediación.	27
<i>Figura 13.</i> Afectación que sufre un contaminante en el ambiente.	31
<i>Figura 14.</i> Degradación aerobia microbiana de hidrocarburos.	32
<i>Figura 15.</i> Vías de Embden Meyerhof Parnas y Entner –Doudoroff para la degradación de hidratos de carbono..	37
<i>Figura 16.</i> Vía glucolítica para la degradación de hidratos de carbono.	37
<i>Figura 17.</i> Esquema de acción emulsificante de algunos biosurfactantes de alto peso molecular.	38
<i>Figura 18.</i> Mapa del distrito de Pachacámac.	41
<i>Figura 19.</i> Etapas del experimento.....	44
<i>Figura 20.</i> Recolección de muestras de raíces de frijol, yuca y arracacha.....	45
<i>Figura 21.</i> Recolección de muestra de crudo de petróleo.	46
<i>Figura 22.</i> Aislamiento primario de cepas nativas presentes en los nódulos de las raíces de frijol, yuca y arracacha.	47
<i>Figura 23.</i> Selección de bacterias <i>Pseudomonas</i> con características de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	48
<i>Figura 24.</i> Tinción de Gram de la bacteria aislada.	48
<i>Figura 25.</i> Adaptación de la bacteria <i>Pseudomonas</i> seleccionadas a diferentes concentraciones con crudo de petróleo.....	52
<i>Figura 26.</i> Preparación de las cepas seleccionadas para la evaluación de la capacidad	

emulsificante.	53
<i>Figura 27.</i> Establecimiento de los tratamientos en el invernáculo.	54
<i>Figura 28.</i> Distribución de los tratamientos.	56
<i>Figura 29.</i> Medición de pH a cada una de las unidades experimentales.	57
<i>Figura 30.</i> Filtración del suelo con Alcohol Etilico.	58
<i>Figura 31.</i> Análisis de Nitrógeno.	59
<i>Figura 32.</i> Análisis de Fósforo.	60
<i>Figura 33.</i> Análisis de Potasio.	61
<i>Figura 34.</i> Conteo de colonias de cada una de las unidades experimentales.	62
<i>Figura 35.</i> Evaluación del porcentaje de remoción de crudo de petróleo de cada unidad experimental mediante metodología Soxhlet.	63
<i>Figura 36.</i> Bacteria <i>Pseudomonas fluorescens</i> aislada de las raíces de la planta del frijol.	65
<i>Figura 37.</i> Bacteria <i>Pseudomonas fluorescens</i> aislada de las raíces de la planta de la yuca.	66
<i>Figura 38.</i> Bacteria <i>Pseudomonas fluorescens</i> aislada de las raíces de la planta de la arracacha.	66
<i>Figura 39.</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> de la raíz de frijol (10X).	67
<i>Figura 40.</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> de la raíz de yuca (10X).	67
<i>Figura 41.</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> de la raíz de arracacha (10X).	67
<i>Figura 42.</i> Actividad Emulsificante de la <i>Pseudomonas fluorescens</i> en cada uno de los tratamientos.	69
<i>Figura 43.</i> Promedio de valores del porcentaje de reducción de un suelo contaminado con crudo de petróleo al 3 % y 5 %, según los días y tratamientos.	71
<i>Figura 44.</i> Promedio de valores de pH, en suelo contaminado con crudo de petróleo al 3 % y 5 %, según días y tratamientos.	73
<i>Figura 45.</i> Promedio de valores de nitrógeno, en un suelo contaminado con crudo de petróleo al 3 % y 5 % según días y tratamientos.	75
<i>Figura 46.</i> Promedio de valores de fósforo en un suelo contaminado con crudo de petróleo al 3 % y 5 % según días y tratamientos.	77
<i>Figura 47.</i> Promedio de valores de potasio, en un suelo contaminado con crudo de petróleo al 3 % y 5 % según días y tratamientos.	79
<i>Figura 48.</i> Promedio de valores del conteo de colonias en un suelo contaminado con crudo de petróleo al 3 % y 5 %, según días y tratamientos.	81

ÍNDICE DE APÉNDICES

	Pág.
Apéndice 1. Registro del porcentaje de reducción de crudo de petróleo	103
Apéndice 2. Registro de los niveles de pH.....	104
Apéndice 3. Registro de los niveles de nitrógeno	105
Apéndice 4. Registro de los niveles de fósforo	105
Apéndice 5. Registro de los niveles de potasio	107
Apéndice 6. Registro del conteo de colonias.....	107
Apéndice 7. Resultados de ANOVA del porcentaje de remoción de crudo de petróleo..	109
Apéndice 8. Prueba de Tukey del porcentaje de remoción del crudo de petróleo	110
Apéndice 9. Valores promedios y desviación estándar (\pm DS) del porcentaje de reducción de crudo de petróleo en los tratamientos a dosis de crudo de petróleo (3 % y 5 %) evaluados a los 30 y 60 días.....	113
Apéndice 10. Resultados de ANOVA del pH	114
Apéndice 11. Prueba de Tukey de los niveles de pH	115
Apéndice 12. Resultados de ANOVA de los niveles de nitrógeno	118
Apéndice 13. Prueba de Tukey de los niveles de nitrógeno	119
Apéndice 14. Resultados de ANOVA de los niveles de fósforo	122
Apéndice 15. Prueba de Tukey de los niveles de fósforo.....	123
Apéndice 16. Resultados de ANOVA del nivel de potasio.....	126
Apéndice 17. Prueba de Tukey de los niveles de potasio.....	127
Apéndice 18. Resultados de ANOVA del conteo de colonias	130
Apéndice 19. Prueba de Tukey del conteo de colonias	131
Apéndice 20. Informe de análisis de suelos - caracterización	134
Apéndice 21. Conteo inicial de bacterias <i>Pseudomonas fluorescens</i> para su inoculación en cada uno de los tratamientos.....	135
Apéndice 22. Datos de procedencia de la muestra de crudo de petróleo.	135
Apéndice 23. Características del contenido de la muestra de crudo Corvina.....	136
Apéndice 24. Registro fotográfico de la investigación.....	136
Apéndice 25. Selección de bacterias del género <i>Pseudomonas</i> con potencial degradador de hidrocarburos.....	141
Apéndice 26. Evaluación de la capacidad emulsificante de las cepas seleccionadas con potencial degradador de hidrocarburos.	142

Apéndice 27. Obtención del inóculo bacteriano de las cepas seleccionadas del género <i>Pseudomonas fluorescens</i> por bioaumentación.	143
Apéndice 28. Recuento de bacterias oleofílicas.	144
Apéndice 29. Evaluación del porcentaje de reducción de crudo petróleo al 3 % y al 5 % en los tratamientos a los 30 y 60 días.	145
Apéndice 30. Protocolo de Ensayo de Nitrógeno Total (N).....	146
Apéndice 31. Protocolo de Ensayo de Fósforo (P).....	147
Apéndice 32. Protocolo de Ensayo de Potasio (K).....	148

RESUMEN

La presente investigación evalúa el potencial degradador de hidrocarburos de bacterias de la especie *Pseudomonas fluorescens* que fueron aisladas de sistemas radiculares de plantas cultivadas en la finca de producción ecológica Casa Blanca, Pachacamac. La investigación se llevó a cabo por dos periodos de 30 y 60 días, durante los meses de setiembre y octubre del año 2017 en el invernáculo de la Universidad Católica Sedes Sapientiae. La investigación consistió en la instalación de seis tratamientos que corresponden T1=1 kg de suelo esterilizado contaminado con 3 % de crudo de petróleo más 100 ml de inóculo bacteriano aisladas de la raíz de frijol. El T2=1 kg de suelo esterilizado contaminado con 5 % de crudo de petróleo más 100 ml de inóculo bacteriano aisladas de la raíz de frijol. El T3=1 kg de suelo esterilizado contaminado con 3 % de crudo de petróleo más 100 ml de inóculo bacteriano aisladas de la raíz de yuca. El T4=1 kg de suelo esterilizado contaminado con 5 % de crudo de petróleo más 100 ml de inóculo bacteriano aisladas de la raíz de yuca. El T5=1 kg de suelo esterilizado contaminado con 3 % de crudo de petróleo más 100 ml de inóculo bacteriano aisladas de la raíz de arracacha. El T6=1 kg de suelo esterilizado contaminado con 5 % de crudo de petróleo más 100 ml de inóculo bacteriano aisladas de la raíz de arracacha. Los tratamientos controles (TC*) y (TC) estuvieron conformados por 1 kg de suelo sin esterilizar contaminado con 3 % y 5 % de crudo de petróleo respectivamente sin inoculación bacteriana con cuatro replicas. Se inocularon 100 ml de cultivo *Pseudomonas fluorescens* de cada cepa para cada tratamiento correspondiente. Se aisló e identificó mediante pruebas morfológicas y bioquímicas como: catalasa, oxidasa, citrato, hidrólisis de gelatina, ureasa y motilidad. Se evaluó los parámetros fisicoquímicos como: la actividad emulsificante, pH, niveles de nitrógeno, fósforo y potasio, conteo de colonias y el porcentaje de biorremediación. Se obtuvo como resultado que a un pH entre 8 a 8,5 mostró valores altos de remoción de crudo de petróleo en donde a una dosis del 3 % en un periodo de 30 días el más eficaz fue el T3 con un 44,10 % y en un periodo de 60 días fue el T1 con 74,70 % de reducción de crudo de petróleo. Y con respecto a una dosis de 5% en un periodo de 30 días el más eficaz fue el T4 con 75,26 % y en un periodo de 60 días fue el T4 con 85,50 %. Se concluyó que la bacteria *Pseudomonas fluorescens* fue efectiva en el proceso de biorremediación de suelos contaminados con crudo de petróleo.

Palabras clave: *Pseudomonas fluorescens*, biorremediación, aislamiento, crudo de petróleo, inoculación, pruebas bioquímicas.

ABSTRACT

In this project was evaluated the hydrocarbon degrading potential of bacterias of species *Pseudomonas fluorescens* which were isolated from root systems of plants grown on the organic production of farm “Casa Blanca”, Pachacámac. This investigation was carried out in two periods of 30 and 60 days during September and October months of 2017 at University Católica Sedes Sapientiae’s Greenhouse. The investigation consisted in the installations of six treatments which concern T1=1 kg sterilized soil contaminated with 3 % of crude oil, plus 100 ml bacterial innocuousness isolated from a bean root. The T2=1 kg of sterilized soil contaminated with 5 % of crude oil, plus 100ml of bacterial innocuousness isolated from a bean root. The T3= 1 kg of sterilized soil contaminated with 5 % of crude oil, plus 100 ml of bacterial innocuousness isolated from a cassava root. The T4=1 kg of sterilized soil contaminated with 5 % of crude oil, plus 100 ml of bacterial innocuousness isolated from a cassava root. The T5=1 kg of sterilized soil contaminated with 3 % of crude oil, plus 100ml bacterial innocuousness isolated from a arracacha root. The T6=1 kg of sterilized soil contaminated with 5% of crude oil, plus 100ml bacterial innocuousness isolated from a arracacha root. The controls treatments (TC*) y (TC) was conformed by 1kg of unsterilized soil contaminated with 3 % and 5 % of crude oil respectively without bacterial inoculation with four replicas 100 ml of *Pseudomonas fluorescens* of each strain were inoculated for each corresponding treatment. It was isolated and identified by morphological and biochemical tests such as catalase, oxidase, citrate, gelatine hydrolysis, urease and motility. It was evaluated the physicochemical parameters such as: the emulsifier activity, pH, levels of nitrogen, phosphorus and potassium, colony count and the percentage of bioremediation. As a result, it was obtained that pH between 8 to 8,5 showed high values of crude oil removal where at a dose of 3 % in a 30-day period the most effective was T3 with 44,10 % and in a period of 60 days was the T1 with 74,70 % reduction of crude oil. And with respect to a dose of 5 % in a period of 30 days the most effective was T4 with 75,26 % and in a period of 60 days was T4 with 85,50 %. It was concluded that the bacterium *Pseudomonas fluorescens* was effective in the process of bioremediation of soils contaminated with crude oil.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*, bioremediation, isolation, crude oil, inoculation, biochemical tests.

INTRODUCCIÓN

Actualmente uno de los grandes problemas que atraviesa la selva peruana, es la contaminación por derrames o vertimientos de hidrocarburos producido por empresas petroleras, que por la falta de un control y monitoreo riguroso de sus operaciones tales como: extracción, almacenamiento, transporte, deterioro o ruptura de tanques de oleoductos, ocasionan serios impactos negativos al ambiente y al ser humano, en un corto o largo plazo. Las principales consecuencias que surgen en el suelo después de un evento de contaminación por hidrocarburos son: la reducción o inhibición del desarrollo de la vegetación, cambios de la dinámica poblacional de la fauna, biota microbiana y la contaminación de cuerpos de agua subterráneas por infiltración (Pardo *et al.*, 2004).

En la actualidad, en el Perú no se tiene una cifra exacta oficial sobre la ubicación y extensión de las áreas afectadas, así como la disposición adecuada de los productos y residuos de la industria del petróleo. Por su parte, la entidad gubernamental encargada del sector de hidrocarburos, Ministerio de Energía y Minas ha publicado la “Guía Ambiental para la Restauración de Suelos en Instalaciones de Refinación y Producción Petrolera” y la “Guía para el Manejo de Desechos de las Refinerías de Petróleo”, en donde apoya y estimula el empleo de diferentes técnicas para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos, entre las que se encuentran la biorremediación (Buendía, 2013).

Existen diferentes métodos para el tratamiento de suelos que han sido contaminados por hidrocarburos, que van desde los químicos hasta los biológicos. Una alternativa amigable con el ambiente es la biorremediación que emplea microorganismos con capacidad para degradar hidrocarburos, en las que implica la búsqueda de una gama de microorganismos en la que se debe seleccionar aquellos que tengan la capacidad y afinidad para degradar hidrocarburos y sus derivados, por lo que se toma como criterio de selección al porcentaje y el tiempo de remoción (Arizaca, 2015).

La bioestimulación y la bioaugmentación son dos técnicas empleadas en la biorremediación

de hidrocarburos, en la primera se añade nutrientes principales como el nitrógeno y fósforo, para favorecer el crecimiento y desarrollo microbiano, mientras que, en la segunda, se adiciona microorganismos endógenos o exógenos de forma *in situ*, incrementando el porcentaje de remoción del contaminante. Estos microorganismos poseen sistemas enzimáticos capaces de fraccionar moléculas de hidrocarburo hasta formas más inocuas y aprovechables en sus procesos metabólicos, “transformándolas” hasta dióxido de carbono y agua, mediante procesos aerobios, mientras que para procesos anaerobios la transformación del hidrocarburo permite la obtención de biomasa CO_2 , N_2 , Mn^{+2} , S^{+2} , Fe^{+2} , CH_4 , entre otros (Boyer, 2000, citado por Ñustez, 2012).

Una de las características más importantes de las bacterias degradadoras de hidrocarburos es la capacidad de emulsificante en solución, mediante la producción de agentes activos de superficie tales como biosurfactantes, estos presentan el gen (AlkB), que codifica para la enzima específica alcano mono oxigenasa, la cual permite la producción de un surfactante, y que con la tensión superficial, ayuda al rompimiento de cadenas carbonadas que están presentes en los hidrocarburos (Hommel, 1990; Neu, 1996; Desai y Banat, 1997; Bredholt *et al.*, 1998, citados por Arizaca, 2015).

Las bacterias del género *Pseudomonas* poseen la habilidad para utilizar diversos substratos, incluyendo aquellos derivados del petróleo. Este género se caracteriza por ser Gram negativas y ubicuas; además, pertenecen a la subclase de la gamma proteobacterias. Las *Pseudomonas* son bacterias productoras de biosurfactantes como los ramnolípidos, involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados a éste (Cruz, 2013). Asimismo, se ha encontrado que la especie *Pseudomonas fluorescens*, degradan el naftaleno y fenantreno, ventaja que tiene frente a las otras *Pseudomonas*, que solo metabolizan naftaleno y asfaltenos (Rockne *et al.*, 2000).

En la presente investigación se propone el empleo de cepas del género *Pseudomonas* aisladas de sistemas radiculares de las plantas cultivadas (frijol, yuca y arracacha) de la finca de producción ecológica Casa Blanca - Pachacámac, para degradar y reducir la presencia de hidrocarburos presente en los suelos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el potencial degradador de hidrocarburos de bacterias del género *Pseudomonas* aisladas de suelos agrícolas de Casa Blanca, Pachacamac.

Objetivos Específicos

- Caracterizar cepas nativas del género *Pseudomonas* a partir de la rizósfera de plantaciones de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* B.) mediante métodos microbiológicos y bioquímicos convencionales.
- Evaluar la capacidad emulsificante de las cepas seleccionadas con potencial degradador de hidrocarburos mediante Espectrofotometría UV-Vis.
- Determinar el porcentaje de reducción de crudo de petróleo al 3 % y 5 % v/v en los tratamientos a los 30 y 60 días.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Escalante (2002) realizó un estudio sobre biodegradación de crudo de petróleo en terrarios, cuyos tratamientos fueron: Terrario uno: Control abiótico + 1 L de hipoclorito de sodio al 5,25 % para inhibir el crecimiento microbiano, Terrario dos: Suelos en condiciones normales + microorganismos nativos del suelo + 5 % de crudo de petróleo, y Terrario tres: Suelo esterilizado + inoculación de consorcio bacteriano exógeno seleccionado + 5 % de crudo de petróleo. Los terrarios fueron establecidos en la intemperie durante 90 días, aireándose semanalmente, y el consorcio bacteriano empleado como inóculo estuvo compuesto de microorganismos oleófilos, aislados de suelos contaminados con crudo de petróleo procedente de la zona de Tromperos, Iquitos. Así mismo, fueron determinados la actividad emulsificante y la identificación taxonómica para posteriormente seleccionar el consorcio microbiano y para finalmente obtener el inóculo. Para las evaluaciones tomaron muestras de suelo de aproximadamente 1 kg al inicio del experimento, y luego cada 30 días, durante 90 días para determinar y cuantificar hidrocarburos totales y los parámetros de humedad, pH, número de microorganismos aerobios mesófilos, oleófilos y temperatura. Los consorcios seleccionados fueron: *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter 4k-1, el género *Bacillus* sp 6Bh-1 y *Serratia rubidaea* Stapp 6B9. Los resultados mostraron que el pH estuvo cercano a la neutralidad. El mayor porcentaje de degradación fue de 92,5 % a los 90 días, y obtuvo ello con el tratamiento del terrario tres que contenía el consorcio bacteriano exógeno, el cual mostró una reducción de 1,2 g de hidrocarburos/25 g de suelo hasta 0,09 g de hidrocarburos/25 g de suelo a los 90 días, a su vez, hubo un incremento de $1,85 \times 10^8$ UFC/ml de microorganismos aerobios mesófilos y $2,12 \times 10^4$ UFC/ml de bacterias oleófilas en promedio.

Barathi y Vasudevan (2003) realizaron un estudio sobre biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo, mediante bioaumentación de *Pseudomonas fluorescens*

NSI, que fue aislada de un suelo contaminado con petróleo crudo, obtenido de Chennai Petroleum Corporation. En esta investigación establecieron nueve tratamientos: A: suelo + petróleo crudo + HgCl₂; B1: suelo + petróleo crudo (control); B2: suelo + petróleo crudo + *Pseudomonas fluorescens* NSI; C1: suelo + petróleo crudo + nutrientes (control); C2: suelo + petróleo crudo + nutrientes + *Pseudomonas fluorescens* NSI; D1: suelo + petróleo crudo + bagazo (20 % v/v) (control); D2: suelo + petróleo crudo + bagazo (20 % v/v) + *Pseudomonas fluorescens* NSI; E1: suelo + petróleo crudo + salvado de trigo (20 % v/v) (control); E2: suelo + petróleo crudo + salvado de trigo (20 % v/v) + *Pseudomonas fluorescens* NSI. Los autores realizaron las evaluaciones de las siguientes variables semanalmente: (a) el nivel de oxígeno, (b) la temperatura, (c) los nutrientes, (d) el pH, (e) humedad, (f) recuento de células viables y porcentaje de alcanos residuales e hidrocarburo. Los resultados mostraron que en la unidad de control abiótico (A) se produjo una inhibición exitosa de los microorganismos del suelo obtenido, cuando fue agregado el cloruro mercúrico y alrededor del 13 % de los alcanos y el 21 % de aromáticos disminuyó abióticamente durante 35 días de incubación; el recuento de células incrementó gradualmente tanto en las unidades B1 y B2, con un porcentaje de degradación de 37 % y 29 % respectivamente, en 35 días. Mientras que la adición de nutrientes inorgánicos permitió el incremento de microorganismos en las unidades, C1 y C2, obteniendo una remoción de alcanos que alcanzaron un 78 % y 88 %, respectivamente, en 35 días. Con respecto a la eliminación de aromáticos presentaron un 82 % y 86 % en los tratamientos C1 y C2, indicando que los nutrientes, en especial el nitrógeno y el fósforo podrían ser un factor limitante o controlado en el proceso de biodegradación de hidrocarburos. Por otro lado, la adición de bagazo aumentó relativamente la actividad bacteriana en las unidades D1 y D2 en comparación con la unidad B1 y B2, en donde el porcentaje de degradación de alcano fue de 75 % y 61 %, del mismo modo, la eliminación de compuestos aromáticos fue aproximadamente de 71 % y 72 % en la unidad D1 y D2 en 35 días. Con el salvado de trigo, el porcentaje de degradación aumentó en 98 % en ambas unidades E1 y E2, en comparación con otras unidades de tratamiento; igualmente, la degradación de alcanos fue mejorada en un 94 % de eliminación en el E1 y 98 % de eliminación en E2.

Samanaez (2008) realizó un estudio sobre biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo. Para realizar la investigación establecieron cinco terrarios contaminados con 1,5 L de crudo de petróleo, de la siguiente manera: Terrario uno:

conformado por bacterias bioaumentadas con la adición de fertilizante inorgánico (B+F), Terrario dos: bacterias bioaumentadas sin fertilizante (B-F), Terrario tres: bacterias nativas con fertilizantes inorgánicos (N+F), Terrario cuatro: bacterias nativas sin presencia de fertilizantes inorgánicos (N-F) y Terrario cinco: control abiótico (CA). El aislamiento y selección de consorcios bacterianos, fue según la capacidad degradativa y emulsificante de suelos procedentes de cultivo de Cañete seleccionándose: (*Pseudomonas aeruginosa* TX-5, *Bacillus* sp. TX-4 y *Acinetobacter calcoaceticus* Beijerinck, Baumann et al. T2X-1), y para la técnica de bioestimulación fueron incorporados fertilizantes inorgánicos con una concentración de (NPK: 20:20:1 y C/N: 100:1). El análisis estadístico empleado fue la prueba multivariada de Wilks, de regresión lineal y t-student. El autor evaluó: la cuantificación de biodegradación de crudo de petróleo, análisis de composición del suelo, concentración de fertilizantes inorgánicos y caracterización del petróleo. Los resultados mostraron que el terrario uno, tuvo mayor porcentaje de biodegradación con un 71,4 %, seguido por el terrario 3, con un 66,7 %, el terrario B-F con un 61,9 %, el terrario cuatro con un 52,3 % y por último el terrario cinco con un 28 %. La población microbiana aumentó a los 30 días del experimento, y con respecto a la degradación de los componentes del petróleo fueron los siguientes: n-decano, n-hexano y n-pentano, en donde el investigador concluyó que cuando el microorganismo dispone de fertilizantes inorgánicos, hay una mayor efectividad en la biodegradación de crudo de petróleo.

Narváez *et al.* (2008) realizaron un estudio sobre la selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburo, procedentes de sedimentos marinos del Caribe colombiano. Realizaron 31 aislamientos bacterianos, a partir de muestras de 50 g del sedimento que fueron recolectados a una profundidad no mayor a 15 cm, para luego ser cultivado en un medio mínimo de sales inorgánicas, suplementado con 1 % de hidrocarburo (ACPM o petróleo crudo) como única fuente de carbono. Asimismo, fueron seleccionadas aquellas bacterias tolerantes a diferentes concentraciones de hidrocarburos: 1 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 % y 10 % de ACPM, y el volumen del inóculo para la selección fue de 0,5 ml. A continuación, fueron incubadas a una temperatura de 35 °C por un periodo de 21 días. Posteriormente, los autores seleccionaron 11 cepas, que fueron tolerantes al crudo y ACPM, e identificadas mediante los siguientes sistemas bioquímicos: BBL crystal y API 50 CHB/E, teniendo como resultado un cultivo bacteriano mixto, identificándose como 9 de las 11 cepas como bacterias correspondientes a los géneros *Klebsiella*, *Chromobacterium*, *Flavimonas*, *Enterobacter*,

Pseudomonas y *Bacillus*. Para la evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburo fueron establecidos los siguientes tratamientos: T0: MMS + ACPM al 2 % v/v y T1: MMS + ACPM al 2 % v/v + el cultivo bacteriano mixto; estos fueron incubados a 30 °C, en agitación a 200 rpm, por 12 días, para posteriormente mantenerse sin agitación hasta cumplir los 21 días. Los autores evaluaron: la biomasa en Unidades Formadoras de Colonias UFC/ml para la elaboración de la curva de crecimiento del cultivo mixto y la remoción de hidrocarburos a los 0, 10 y 21 días. El análisis estadístico empleado para los datos de remoción de hidrocarburos aromáticos fue la prueba de Shapiro Wilk y la homogeneidad de varianzas por medio del Test de Barlett; cumplidos estos dos supuestos, procedieron al análisis de varianza con un nivel de significancia de 5 % para evaluar las diferencias entre los dos tratamientos en la degradación de ACPM, a través del tiempo de muestreo. Los resultados mostraron que el cultivo mixto degradó 68,6 % de los hidrocarburos alifáticos, con preferencia para los n-alcenos de cadena larga (C₁₂-C₃₁), alcanzando un crecimiento máximo de 3,13x10⁹ UFC/ml mientras que por factores abióticos se removió el 23,54 %.

Llenque (2011) realizó un estudio sobre aislamiento e identificación de bacterias heterótrofas de suelos contaminados con petróleo provenientes de oleocentros de la ciudad de Trujillo, Perú. Las muestras de suelos fueron recolectadas de dos grifos, fueron pre-enriquecidas por cinco días con petróleo al 0,5 % e incubadas a temperatura ambiente, para luego ser diluidas hasta 10⁻² y ser sembradas en agar nutritivo. Luego las bacterias fueron caracterizadas y subcultivadas con petróleo al 1 %, seleccionándose aquellos cultivos que mostraron crecimiento mediante la turbidez del medio, cuando fueron incubados a una temperatura de 37 °C por 48 horas. Las bacterias seleccionadas nuevamente fueron subcultivadas en medio fresco e incubadas en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, luego pasaron a ser sembradas en caldo mínimo de sales más petróleo al 1 %, en donde solo cinco cultivos mostraron crecimiento. Los resultados de la caracterización morfológica mediante la observación microscópica mostraron que fueron cocos Gram (-) y bacilos, cuyas colonias son caracterizadas por ser cremosas, brillantes y planas correspondiendo al cultivo del género *Pseudomonas*, las cuales mostraron gran capacidad de crecimiento en ambientes contaminados con petróleo en condiciones ensayadas con petróleo a 1 %.

Kumar *et al.* (2014) realizaron un estudio sobre biorremediación de hidrocarburos de petróleo mediante el uso de *Pseudomonas* aisladas de suelos industriales de la India contaminados con petróleo obtenidas de la bomba diésel y la otra a 10 m de distancia de esta. Para el proceso de aislamiento realizaron diluciones en serie y la siembra respectiva en medios estériles específicos, fue caracterizada mediante análisis molecular y métodos bioquímicos. Fueron utilizados cinco frascos que contenían 50 ml de caldo de King B esterilizados y suplementado con diferentes concentraciones de diésel: al 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 % los que fueron incubados a una temperatura de 37 °C y agitación constante, durante 24 horas a un pH de 8,0. Asimismo, inocularon 1 ml de las cepas bacterianas en cada tratamiento, mientras que el control fue caldo y aceite diésel, que fue almacenado a una temperatura de 4 °C hasta su respectivo examen. Los frascos utilizados con el contenido de cada tratamiento fueron incubados en un agitador manteniéndose a una temperatura de 30 °C durante siete días. Para la determinación del crecimiento fueron evaluados la densidad óptica y el nivel óptimo de diésel. Además, los autores analizaron el efecto a distintas temperaturas: (10 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C y 50 °C) y a diferentes pH de (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12) en el proceso de degradación de hidrocarburos. Los resultados mostraron que la degradación fue detectada por la formación de una zona clara y la presencia de colonias bacterianas pertenecientes al género *Pseudomonas*, para las dos muestras de suelo. El mayor crecimiento fue a una temperatura de 37 °C y a un pH mayor a 8,0, lo que indicó el máximo aprovechamiento de diésel alcanzado una degradación del 54 %, como de la producción de la proteasa y de la ureasa durante la utilización de diésel.

El-Khawaga *et al.* (2015) realizaron un estudio sobre el potencial de biodegradación de la especie *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* biotipo A, aisladas de un suelo contaminado con aceite de petróleo de compañías petroleras en Egipto. La selección de estas cepas fue por su capacidad de degradar el petróleo, como única fuente de carbono y su identificación fue mediante la técnica Biolog. Los autores inocularon varios matraces cónicos de 100 ml cada uno con 50 ml de medio mineral con los cultivos bacterianos seleccionados, mientras que los matraces sin bacterias fueron mantenidos como control. El diseño del experimento consistió en tres temperaturas diferentes (25 °C, 30 °C y 40 °C), cinco valores de pH (5, 6, 7, 8 y 9), a cinco concentraciones de aceite de petróleo (1 %, 3 %, 5 %, 7 % y 9 %), y fueron incubadas en un agitador orbital a 0, 50, 100 y 150 rpm, por un periodo de 30 días. En esta investigación fueron determinados los recuentos bacterianos (log

UFC/ml) y el ensayo de hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) (μg de fluoresceína/ml de cultivo). Además, en los mismos intervalos de tiempo, fueron determinados el pH de los cultivos y los residuos de aceite de petróleo por gravimetría y por cromatografía líquida sólida. Los resultados mostraron que la tasa de degradación del petróleo aumentó gradualmente con el tiempo de incubación con las dos especies. Por lo tanto, *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* alcanzaron un porcentaje de degradación de 62,46 % y 55,53 % del aceite de petróleo agregado, respectivamente. Este estudio mostró que la *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* (biotipo A) tienen la capacidad de degradar el petróleo a una temperatura de 30 °C, pH de 7, valor de velocidad de agitación de 150 rpm y concentración de petróleo a 1 % para las dos especies. Además, la especie *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* biotipo A tienen la capacidad de degradar hidrocarburos alifáticos a mayor velocidad que los compuestos aromáticos, mientras que la reducción de fracciones alifáticas y aromáticas ocurrió más que asfaltinas y resinas.

Muñoz (2016) determinó el poder de biorremediación de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* y el hongo *Trichoderma* sp. que fueron aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos, donde fueron tomados 12 muestras de suelos de la parroquia de Puembo, ubicada al nororiente de la ciudad de Quito, Ecuador. Establecieron los siguientes tratamientos: T0: Suelo testigo sin inoculación de alguna bacteria ni hongo, T1: Suelo + *Trichoderma* sp., T2: Suelo + *Pseudomonas fluorescens* y T3: Suelo con *Trichoderma* sp. + *Pseudomonas fluorescens*. Fueron evaluadas las siguientes variables: humedad, pH, textura, temperatura, conductividad eléctrica y análisis fisicoquímicos del suelo (materia orgánica (MO), K, P, Mg asimilable, Ca, Sodio intercambiable, Fe, Zn, Mn, S, B y Cu), TPH al inicio y al final por un periodo de tres meses. Esta investigación utilizó el diseño estadístico de DBCA (Diseño de bloques completos al azar) constituido con 16 unidades experimentales, cuatro tratamientos y cuatro repeticiones, establecidos homogéneamente en condiciones ambientales. Posteriormente fue añadido la luz artificial mediante focos fluorescentes proporcionando una temperatura de 20 °C y para las variables utilizaron la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y Tukey con un nivel de significancia del 5 %. Los resultados mostraron que cada uno de los tratamientos actuaron tanto en consorcio como de manera individual, destacando el T3 (*Trichoderma* sp + *Pseudomonas fluorescens*) el más eficaz degradando 379,2 mg/kg de TPH (91 % de degradación), esto es debido a que ambos poseen mecanismos dispensables para la degradación de moléculas de hidrocarburos en condiciones

ambientales adecuadas evidenciando que la utilización de un consorcio de microorganismos degradan el hidrocarburo presente, seguido por el T2 con 396,1 mg/kg y finalmente el T1 con 714,1 mg/kg.

Peekate *et al.* (2018) investigaron la efectividad de la *Pseudomonas fluorescens* y su producción biosurfactante en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, que fue reactivada en caldo a temperatura ambiente durante siete días en un agitador orbital multifuncional PSU-20i (Keison Products, Reino Unido) operado a 150 rpm. Los autores establecieron tres tanques fabricados con paneles de vidrio rectangulares de color ámbar, en donde colocaron aproximadamente 5 kg de tierra contaminada con aproximadamente 500 ml de gasóleo 1:1 y mezcla de aceite de motor usado. Establecieron tres tratamientos: Tanque BS: 100 ml de solución biosurfactante bruta, Tanque PA: 100 ml de caldo de cultivo de 24 horas de la especie *Pseudomonas fluorescens* y el CT: Tanque control que solo es el suelo contaminado con petróleo. El contenido de humedad de los suelos en todos los tanques fue ajustado a aproximadamente 10 % usando agua destilada estéril (35 °C - 40 °C) el cual fue verificado semanalmente. La aireación fue realizado dos veces a la semana con la ayuda de una llana manual desinfectada. Fueron evaluados muestras de suelos de aproximadamente 50 ml determinándose los siguientes parámetros: pH, concentración total de hidrocarburos (THC) mediante el método espectrofotométrico, cantidad de bacterias heterótrofas totales (THB) e hidrocarburos con población bacteriana (HUB). Además, los autores emplearon el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si había alguna diferencia significativa entre la degradación de hidrocarburos y los diferentes tratamientos en tanques para la biorremediación. Los resultados mostraron que la producción de biosurfactante fue reducido con respecto a la tensión superficial del caldo de cultivo de 60,04 mN.m⁻¹ a 30,64 mN.m⁻¹. Por otro lado la adición del biosurfactante a tierra contaminada con hidrocarburos de petróleo disminuyó aproximadamente en 69 % la concentración de hidrocarburos, con una variación en la configuración de la población de HUB de 1,70 × 10⁴ - 4,80 × 10⁶ UFC.g⁻¹, mientras que, la adición de la bacteria disminuyó en 66 % en la concentración de hidrocarburos y una variación en la configuración de HUB de 2,17 × 10⁴ - 1,35 × 10⁶ UFC.g⁻¹, y por último el tratamiento control mostró un 50 % de disminución y una variación de la población de HUB de 6,33 × 10³ - 9,15 × 10⁴ UFC.g⁻¹, indicando así que el grado de atenuación de hidrocarburos mediante el uso de biosurfactante fue mayor que el uso de la bacteria, mostrando que no hay diferencia significativa entre el uso de la bacteria

productora de biofluorescencia y su biosurfactante en la biorremediación de hidrocarbón de petróleo contaminado el suelo.

1.2. Bases teóricas especializadas

1.2.1. *Phaseolus vulgaris* L. “frijol”

a. Origen y taxonomía

El nombre completo es *Phaseolus vulgaris* L., asignada por Linneo en 1753, más conocido como frijol, de la familia Fabaceae (Plants.usda.gov, 2019), se encuentra dentro del grupo de leguminosas que poseen semillas comestibles, un componente esencial en la dieta y está distribuida en los cinco continentes en todas sus variaciones. El frijol es considerado como uno de los más antiguos, algunos hallazgos arqueológicos indican que se conocían hace algunos 5000 años antes de Cristo en México y Sudamérica. Las culturas precolombinas y el interés del hombre por esta leguminosa generó variaciones en forma y con eso diferentes nombres como: frijol, poroto, alubia, judía, frijol, nuña, habichuela, vainita, caraota y feijao (Ulloa *et al.* 2011).

b. Morfología

Debouck y Hidalgo (1985) describe las siguientes partes morfológicas del “frijol” (*Phaseolus vulgaris* L.):

- **Tallo**

El tallo puede ser identificado como el eje central de la planta, el cual está conformado por una sección de nudos y entrenudos; en cada uno se encuentra una estípula, una hoja. Y entre el peciolo de la hoja y la prolongación del tallo, es decir, en las axilas, se encuentran estructuras vegetativas como las ramas o reproductivas como las inflorescencias.

- **Hojas**

Las hojas del frijol son de dos tipos: hojas simples y compuestas. Estas hojas están insertadas

en los nudos que presentan las ramas y el tallo (Figura 1). En dichos nudos siempre se encuentran estípulas que constituyen un carácter importante en la sistemática de las leguminosas. Las hojas compuestas trifoliadas (tres) son las hojas representativas del frijol, mientras que las hojas primarias son simples y aparecen en el segundo nudo de la parte de la estructura del tallo que inician su desarrollo en la semilla durante el proceso de embriogénesis.



Figura 1. Hojas primarias. Fuente: Ramírez (2015).

- **Fruto**

Es una vaina con dos valvas (Figura 2), las cuales provienen del ovario comprimido, esta especie se clasifica como leguminosa. Los óvulos, que son las futuras semillas, alternan en la sutura placentar; en consecuencia, las semillas también alternan en las dos valvas.

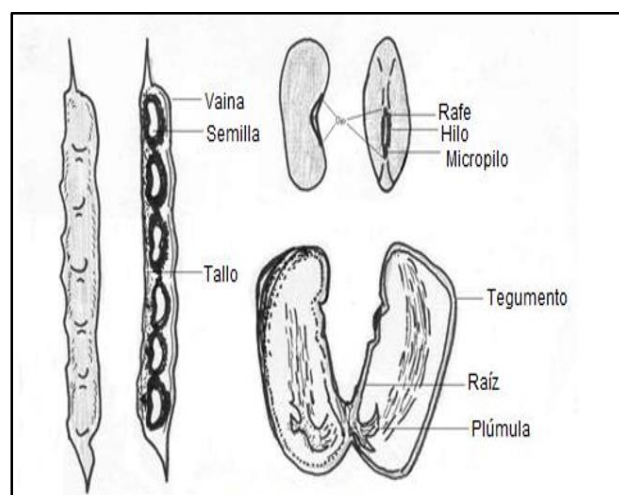


Figura 2. Vaina y semilla del frijol. Fuente: Valladares (2010).

- **Semilla**

La semilla es exalbuminosa es decir que no posee albumen, por lo tanto, las reservas nutritivas se concentran en los cotiledones. La semilla puede tener varias formas: cilíndrica, ovalada, esférica u otras.

- **Sistema radicular**

El sistema radical está formado por la radícula del embrión la cual se convierte posteriormente en la raíz principal o primaria, es decir, la primera identificable (Figura 3). A los pocos días de la emergencia de la radícula es posible ver las raíces secundarias, que se desarrollan especialmente en la parte superior o cuello de la raíz principal, se denominan secundarias debido a que su desarrollo ocurre a partir de la raíz principal o primaria. Sobre las raíces secundarias se desarrollan las raíces terciarias y otras subdivisiones como los pelos absorbentes, los cuales se encuentran en todos los puntos de crecimiento de la raíz.



Figura 3. Raíz de la planta del frijol. *Fuente:* Cantaro (2015).

c. Fases fenológicas del frijol

El desarrollo del crecimiento de la planta de frijol comprende dos fases sucesivas: la vegetativa y la reproductiva en donde comprende dentro de ellas 10 etapas bien definidas de desarrollo (Figura 4).

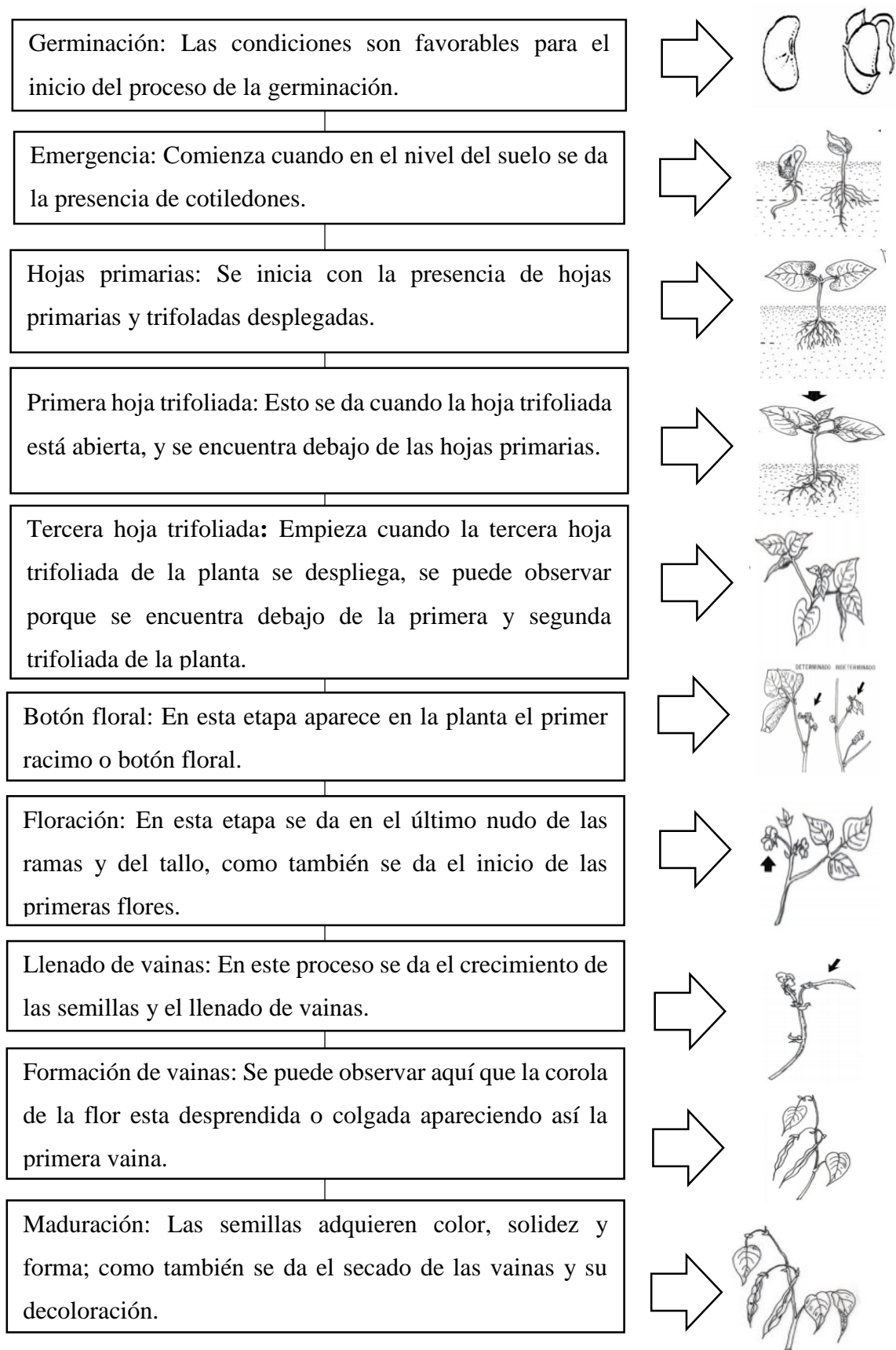


Figura 4. Fase fenológica de la *Phaseolus vulgaris* L. Fuente: Servicio Nacional de Metereología e Hidrología del Perú [SENAMHI] (2012).

d. Valor Nutritivo

En la Tabla 1 se muestra el valor nutritivo del frijol.

Tabla 1

Contenido nutricional por cada 100 g de materia seca de frijol

Contenido Nutricional del frijol	
Energía	337 kcal
Proteína	22 g
Grasa	1,6 g
Carbohidratos	60,8 g
Ceniza	3,6 g
Calcio	8,6 g
Fósforo	247 mg
Hierro	7,6 mg
Tiamina	0,5 mg
Riboflavina	0,19 mg
Niacina	2,1 mg
Vitamina C	3 mg
Retinol equival	2 µg

Fuente: INCAP (1986), citado por Villanueva (2010, p. 4).

1.2.2. *Manihot esculenta* Crantz “Yuca”

a. Origen y Taxonomía

Esta planta también conocida como yuca, mandioca o casava, cuyo nombre científico es *Manihot esculenta* Crantz, perteneciente a la familia Euphorbiacea (Plants.usda.gov, 2019), originaria de Sudamérica y expandida por zonas tropicales en América, Asia y África; es rica en almidón y en tiempos anteriores era utilizada por los indígenas para la elaboración del pan llamado “Casabe” (Duarte y Figueroa, 2008). La yuca es una planta de arbusto perenne, leñoso, tamaño variable y fotoperiodo corto, se caracterizan por su notable

desarrollo de los vasos laticíferos, compuestos por células secretoras llamadas galactocitos lo que produce la secreción lechosa (Pérez, 2013).

b. Morfología

Suárez y Mederos (2011) describen las siguientes partes morfológicas de la yuca *Manihot esculenta*.

- **Tallo**

Es una parte principal de la yuca puesto a que, se utiliza para la reproducción asexual y vegetativa. Su forma es cilíndrica y varía de dos a seis centímetros de diámetro, estos están formados por la alternación de nudos (el punto de unión de la hoja con el tallo) y entrenudos, el color varía con la edad de la planta, variedad, fertilidad disponible para la planta y sequías (Figura 5).



Figura 5. Tallo de la planta de la yuca. *Fuente:* Suárez y Mederos (2011).

- **Hojas**

Es el órgano en donde ocurre la fotosíntesis, en donde se da el cambio de energía radiante en energía química. Las hojas de la yuca son simples y están compuestas por la lámina foliar (palmeada y profundamente lobulada) y el peciolo (Figura 6), su tamaño, variedad, y el color depende bastante de los factores y condiciones ambientales.



Figura 6. Hojas de la planta de la yuca. *Fuente:* Suárez y Medereos (2011).

- **Fruto**

El fruto mide aproximadamente de 1 a 2 cm de diámetro, el tiempo de maduración es entre 3 y 5 meses, es aristado (seis aristas longitudinales, estrechas y prominentes), dehiscente y semicircular.

- **Semilla**

Es la parte de reproducción sexual de la planta, mediante la semilla se puede mejorar el gen de la planta. La semilla mide entre 1 cm de largo, 4 mm de espesor y 6 mm de ancho; presente una forma ovoide-elipsoidal.

c. Sistema Radicular

Las raíces muestran una baja densidad y con una penetración profunda en el suelo de 2,5 cm que son efectuada por las raíces delgadas, posteriormente se da el inicio del engrosamiento de estas, lo cual favorece a la planta que tenga la capacidad de soportar periodos de sequía. Las raíces fibrosas que posee la planta permiten absorber los nutrientes y agua, pero cuando ellas se agrandan se vuelven tuberosas (Figura 7) y pierden esta capacidad de absorción, esto se debe en el momento en que se inicia la acumulación de almidones, y el sentido de la raíz cambia de longitudinal a radial (Ceballos y De la Cruz, 2002).

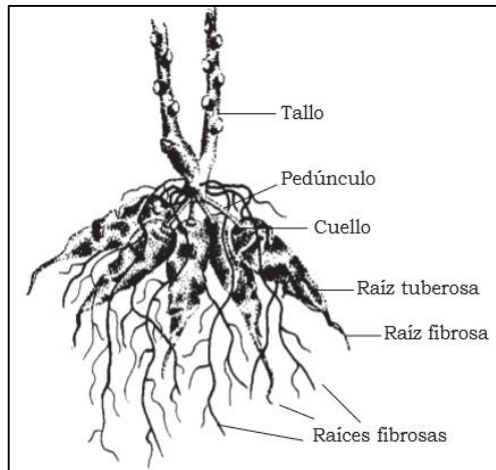


Figura 7. Componentes del sistema radical de la yuca. Fuente: (Domínguez *et al.*, citado por Ceballos y De la Cruz, 2002, p. 25).

d. Fase fenológica de la yuca

El desarrollo de la planta de yuca comprende de 5 etapas (Figura 8) bien definidas de desarrollo.

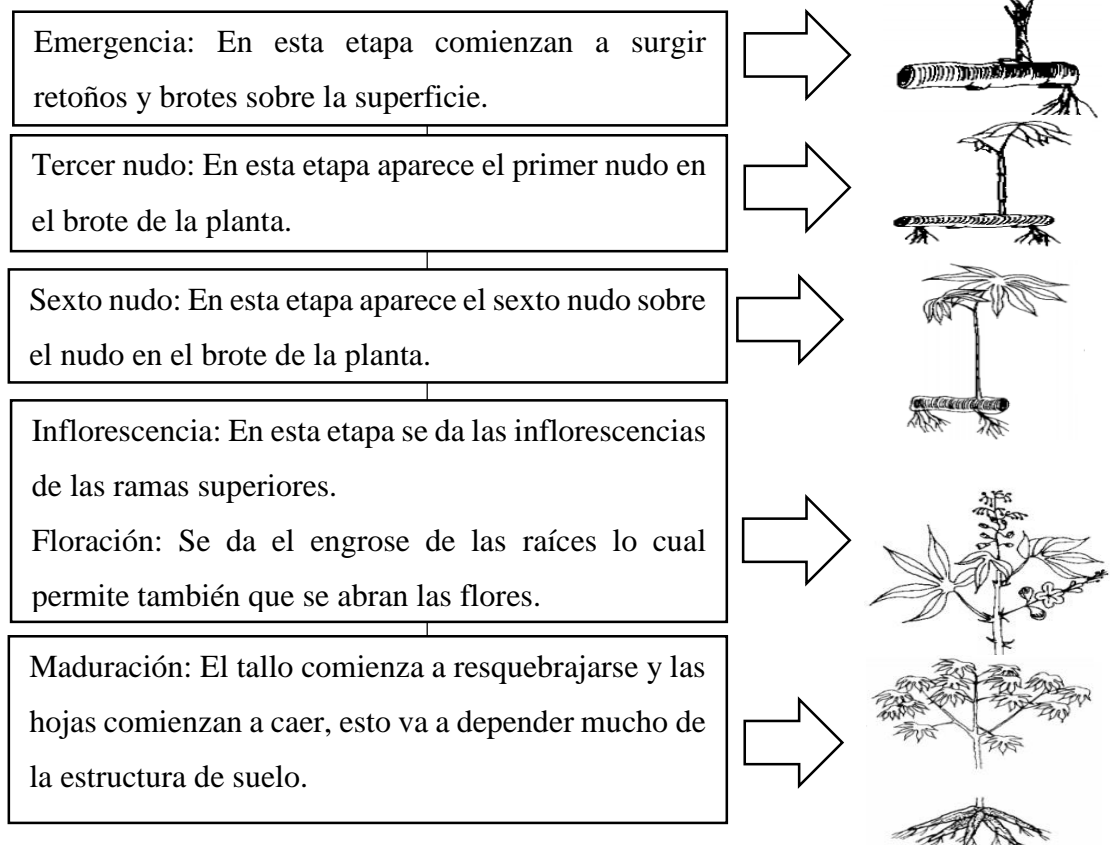


Figura 8. Fase fenológica de la yuca. Fuente: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú [SENAMHI] (2012).

e. Valor nutritivo de la raíz

En la raíz se da el proceso almacenamiento de energía, lo cual permite los diversos usos en la alimentación humana y animal por su gran contenido (Tabla 2) en hidratos de carbono, pobre en proteínas, grasas y muy buena fuente en vitaminas B y C, además de magnesio, potasio y calcio (Carvajal y Insuasti, 2010).

Tabla 2

Composición nutricional de la yuca

Componentes	Cantidad
Calorías	120 cal
Proteínas	3,1 g
Grasas	0,4 g
Hidratos de carbono	26,9 g
Magnesio	66 g
Potasio	764 g
Vitamina B6	0,3 g
Vitamina C	48,2 mg
Almidón	19 %

Fuente: Carvajal y Insuasti (2010).

1.2.3. *Arracacia xanthorrhiza* Bancr. “Arracacha”

a. Origen y taxonomía

Es una de las plantas cultivadas más antiguas de la etapa preinca, conocida como arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.), perteneciente a la familia Apiaceae (Plants.usda.gov, 2019), cultivadas en las regiones andinas, en las Antillas, en América Central, África y en Brasil cuya domesticación precedió a la papa, forma parte de los tubérculos (Cobo *et al.* 2013).

b. Morfología

Seminario (2004) describe las siguientes partes morfológicas de la “arracacha” (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.).

- **Tallo**

Es la parte principal de la planta, es corto y presenta nudos muy próximos con abundantes hojas basales envainadoras. El tallo florífero está formado a partir de la yema apical en donde posee hojas caulinares alternas e inflorescencias laterales y/o terminales.

- **Hojas**

La planta posee hojas basales (son pecioladas, lámina compuesta, pinnada con foliolos basales compuestos y los apicales simples, borde dentado a denticulado) y hojas caulinares (presentan vainas desarrolladas e infladas) (Figura 9). Durante el primer año de vida de la planta se forman diferencias entre las hojas basales y las caulinares en el tiempo de desarrollo del tallo florífero.



Figura 9. Hojas de la planta arracacha. Fuente: Placencio (2012).

- **Fruto**

El fruto presenta una morfología oblongo u ovoide, estrecho hacia el ápice, comprimido lateralmente, glabro o pubescente y costillas poco a muy prominentes dejando entre ellas surcos superficiales o profundos.

- **Sistema Radicular**

La raíz es la parte principal de la planta, puesto a que es el medio de propagación, y a la vez es allí donde se acumula la mayor parte de nutrientes. Puede ser de color blanco, violáceo o amarillo (Figura 10), en la parte inferior de la raíz emite de 4 a 10 raíces laterales con características engrosada, ovioides o cilindro-cónica, con una longitud que varía entre 5 cm y 25 cm de largo por 2.5 a 6 cm de diámetro (Añez *et al.* 2002).



Figura 10. Raíz de la arracacha. Fuente: Placencio (2012).

c. Fase fenológica de la arracacha

El proceso de germinación es lento y desuniforme principalmente por la dormancia y la presencia de patógenos (Sediyama *et al.*, 1990). El periodo vegetativo varía de 10 a 14 meses de acuerdo con la altitud de la siembra (Higuita, 1968; Acosta, 1979; Castillo, 1984 y Hermann, 1991, citados por Mazón *et al.* 1996, p. 13), la maduración se puede observar a partir del amarillento de las hojas.

d. Valor nutritivo

La arracacha está considerada como un alimento energético y nutritivo (Tabla 3), puesto a que en su composición (Tabla 4) se destacan los carbohidratos en relación con los demás nutrientes como: el almidón y azúcares totales, y niveles de minerales como: el calcio, fósforo, hierro, además de la vitamina A y niacina (Gerencia Regional de Recursos Naturales y Gestión del Medio Ambiente, 2006).

Tabla 3

Valor nutritivo de la arracacha

Vitaminas	100 g de material fresco
Vitamina A	1,759
Tiamina	0,08
Riboflavina	0,04
Niacina	4,5
Piridoxina	0,03

Fuente: Santos y Pereyra (1994) y Tapia (1990), citados por Gerencia Regional de Recursos Naturales y Gestión del Medio Ambiente (2006).

Tabla 4

Composición química de la arracacha

Componentes	g/100 g de materia fresca	
	Promedio	Variación
Humedad	74,00	64,12 – 61,37
Sólidos totales	26,00	16,83 – 34,14
Carbohidratos	24,91	19,25 – 29,87
Proteínas	0,96	0,60 – 1,85
Lípidos	0,26	0,19 – 0,35
Cenizas	1,30	1,05 – 1,38
Fibras	0,85	0,60 – 1,24
Almidón	23,51	16,91 – 25,49
Azúcares totales	1,66	0,65 – 1,98
Calorías	104	96 – 126

Fuente: Santos y Pereira (1994); Tapia (1990) y Franco (1982), citados por Gerencia Regional de Recursos Naturales y Gestión del Medio Ambiente (2006, p. 12).

1.2.4. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

En el suelo existe una gran cantidad de microorganismos como hongos, bacterias, y también se dan la asociación de hongos y plantas, entre todos ellos encontramos a las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas; estas colonizan en la rizósfera y en la superficie de las raíces, se introducen y se proliferan en el interior de las raíces, para luego trasladarse al sistema vascular. Como base principal es la fijación biológica del nitrógeno.

La síntesis de las auxinas una de las fitohormonas produce la proliferación de pelos radicales, crecimiento de raíces beneficiando a la planta con la absorción de minerales y agua del suelo. Muchas rizobacterias favorecen en la inhibición de la propagación de microorganismos fitopatógenos (Caballero, 2006).

La especie *Pseudomonas fluorescens* M. y la *Pseudomona putida* Trevisan, Migula, son bacterias que poseen un gran rango de metabolitos y enzimas que pueden tener un efecto antagónico sobre diversos fitopatógenos con tan solo la activar los compuesto de defensa que es la inducción de resistencia sistemática (Saravanakumar *et al.* 2007, citado por Caviedes, 2010, p. 16).

1.2.5. Crudo de petróleo

La derivación de la palabra petróleo proviene del latín *Petroleum*, formado por dos palabras: *petra*, como significado piedra y *óleum*; aceite, determinándose como una “mezcla heterogénea de compuestos orgánicos, principalmente hidrocarburos insolubles en agua”. Es un recurso natural no renovable y su forma general es C_nH_{2n+2} , siendo uno de los más importantes de la historia por su gran diversidad de compuestos y sus diferentes usos de su derivación (Cando, 2011).

1.2.6. Hidrocarburos

La composición elemental del crudo está constituida por dos átomos de hidrógeno, por cada átomo de carbono, con menos del 1 % (v/v) de elementos como el fósforo, níquel, vanadio y con menos del 3 % (v/v) de elementos como el oxígeno, nitrógeno y azufre (Okoh, 2006).

Cada una de las categorías de hidrocarburos agrupa compuestos con características de volatilidad, solubilidad y toxicidad propias. Los hidrocarburos pueden ordenarse de menor a mayor biodegradabilidad en: compuestos polares > aromáticos pesados > alcanos cíclicos > aromáticos ligeros > alcanos ramificados > alcanos lineales (Ponce, 2014).

1.2.7. Composición del crudo de petróleo

Los compuestos conformados del petróleo varía en cuanto a su clase y proporción (Tabla 5), principalmente conformados por carbono (C) e hidrógeno (H), y en su mayoría naftenos, parafinas y aromáticos y menor cantidad de nitrógeno, azufre y oxígeno y constituyentes metálicos (Cando, 2011).

Tabla 5

Composición elemental del petróleo

Elementos	Porcentaje
Carbono	83 – 87 %
Hidrogeno	11 – 16 %
Azufre	0 – 4 %
Oxigeno	0 – 3,5 %
Nitrógeno	0 – 0,05 %

Fuente: Cando (2011).

Feijoo (2012) indica que para estudiar los crudos y sus fracciones por tipo de contaminante, especialmente las fracciones pesadas es necesario a las siguientes familias:

- a. **Saturados:** Comprende hidrocarburos no polares compuestos por carbono y hidrogeno unidos por enlaces simples, mediante cadenas lineales (parafinas o n-alcanos) o cadenas cíclicas ramificadas (Fernández, 2017).
- b. **Aromáticos:** Comprende hidrocarburos polares, aquellos que presenta un anillo bencénico en su estructura.
- c. **Resinas:** Comprende hidrocarburos con polaridad alta, aquellos que presentan entre 4 a 8 anillos bencénicos en su estructura, con pequeñas cantidades de metales pesados, oxígeno, azufre y nitrógeno.
- d. **Asfaltenos:** Comprende una gran cantidad de heteroátomos del crudo de petróleo beneficiando la formación de agregados de alto peso molecular, insoluble en n-heptano o n-pentano pero si soluble en tolueno.

1.2.8. Composición por familias de hidrocarburos

Torres y Zuluaga (2009) indican los hidrocarburos de un crudo de petróleo se constituye en las siguientes familias:

- a. **Parafinas volátiles.** En su mayoría son el 30 % del crudo de petróleo. Son considerados como isoprenoides y n – alcanos de un tamaño C1 a C10 (2,6 dimetil octano). Se caracteriza esta familia por ser muy volátil en presencia de oxígeno entre ellos esta los isoprenoides representados por el isopentano e isobutano (Howe-Grant, 1996).
- b. **Parafinas no volátiles.** Son aquellos “isoprenoides y n – alcanos entre C11 y C40” y son parte del 15 % y 20 % de crudo no degradados, los isoprenoides varían de C12 a C22 formando parte del 1 % y 2 % del crudo y un 15 % en crudos degradados. Los componentes que se encuentran entre C11 y C15 tienen de característica una volatilidad media en presencia de oxígeno.
- c. **Naftenos.** Está formada por cicloalcanos o cicloparafinas, en su gran mayoría compuesto por los ciclopentanos con un 31 % de crudo de petróleo. Y entre los 50 % y 55 % se encuentran los mono y dicíclicos, el 20 % los tricíclicos y por último con un 25 % los tetracíclicos.
- d. **Oleofinas.** Esta familia se encuentra en menor proporción en el crudo de petróleo, con un 30 % en gasolinas y 1 % en fueles, es la parte última del proceso del cracking conteniendo unas mínimas trazas de crudo de petróleo.
- e. **Aromáticos.** Es parte de la mezcla compleja del crudo de petróleo, conteniendo en su estructura varios anillos bencénicos. Y así se describe los siguientes tipos de hidrocarburos:
 - **Hidrocarburos monoaromáticos.** Estos poseen un anillo bencénico, dentro de ellos está el benceno y sus alquilados formando la familia del benceno, tolueno, etilbenceno y xileno, de características de importancia para el ambiente, gracias a su toxicidad y volatilidad.

- **Hidrocarburos poliaromáticos.** Estos poseen dos anillos bencénicos, dentro de este grupo se encuentran el naftaleno y sus alquilados. Como también están los de tres anillos que son el fenantreno, fluoreno, antraceno y sus derivados. Y finalmente encontramos los que tienen más de tres anillos como el fluoranteno, criseno, pireno y coroneno.
- f. **Resinas y asfaltenos.** Integran mezclas bien complejas por núcleos naftenoaromáticos o policíclicos; contenidas de cadenas hidrocarbonadas con heteroátomos de azufre, nitrógeno, oxígeno, y con cantidades menores de metales.

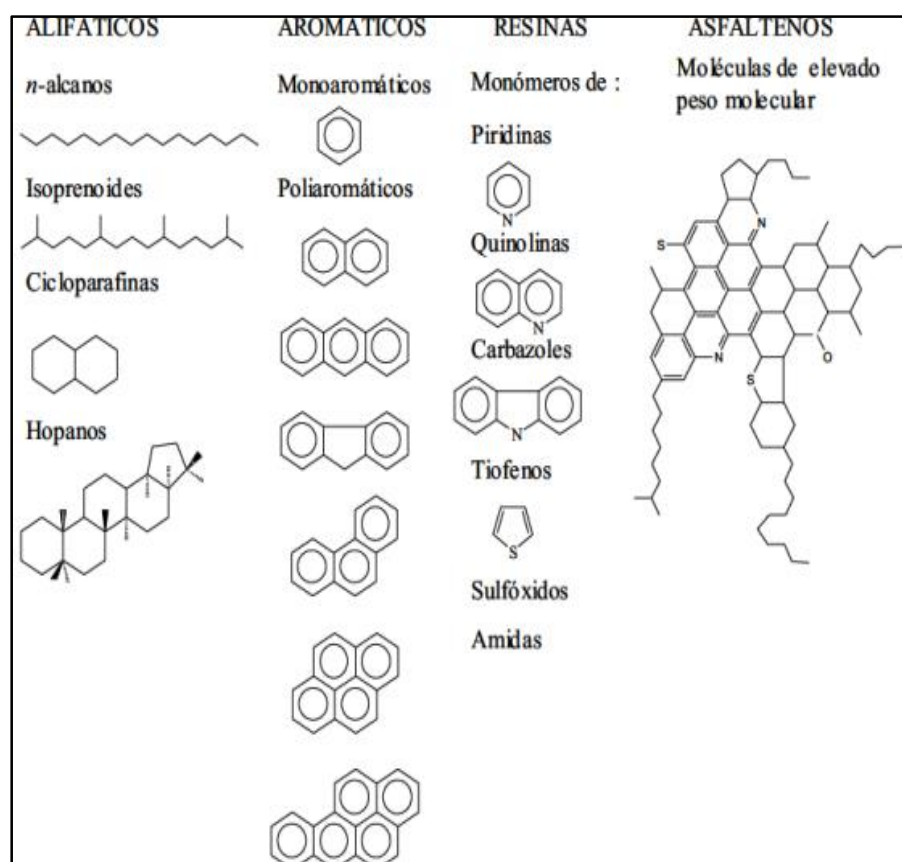


Figura 11. Estructuras químicas de diferentes compuestos mayoritarios del petróleo. Fuente: Torres y Zuluaga (2009).

1.2.9. Tipos de biorremediación

Velasco y Volke (2002), citados por Ponce (2014) indica que la biorremediación se subdivide en cuatro grupos (Figura 12) esto va depender de las características y necesidades del problema a tratar.

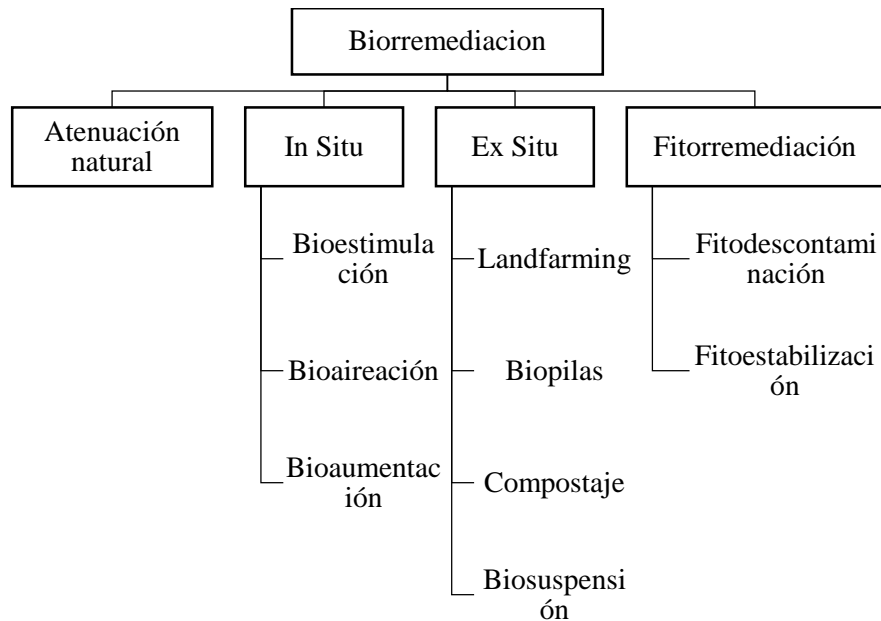


Figura 12. Tipos de biorremediación. Fuente: Ponce (2014).

Ponce (2014) indica que por el lugar de realización del proceso de biorremediación se divide en:

- a. **In situ:** Este procedimiento se da cuando el suelo contaminado es tratado en el mismo sitio, o como también los contaminantes presentes en el suelo contaminado son extraídos sin necesidad de retirar el suelo.
- **Bioaireación o bioventeo:** En este proceso se estimula el suelo contaminado en donde se da una biodegradación natural promoviendo la actividad de los microorganismos presentes en el subsuelo que se encuentran allí dentro, a través de volteos (aireación, a través de gases, como el metano), y es importante conocer la permeabilidad del suelo a los gases.
- **Bioestimulación:** En este proceso consiste en el ajuste de variables fisicoquímicas en el sitio a tratar estimulando el crecimiento de la microflora autóctona degradadora (Bocángel, 2016).
- **Biodegradación aerobia:** En este proceso se da en presencia de oxígeno y otros nutrientes, aquí las acciones de los microorganismos hacen que degraden los contaminantes orgánicos hasta convertirlos finalmente en dióxido de carbono, agua y nueva biomasa celular.

- **Biodegradación anaerobia:** En este proceso se da sin ninguna presencia de oxígeno, los contaminantes presentes en este suelo son metabolizados hasta llegar como aceptor final el metano y en cantidades menores de hidrógeno molecular, ácido sulfúrico, dióxido de carbono y amoníaco.
 - **Bioaugmentación:** En este proceso se añade una alta concentración de microorganismos vivos capaces de degradar los contaminantes, para ayudar al proceso puesto a que la cantidad de microorganismos que hay en ese suelo es insuficiente para este proceso de degradación.
 - **Atenuación natural:** Este proceso es una técnica de bajo costo y de forma natural a través del tiempo, consiste en la utilización de procesos fisicoquímicos de interacción contaminante-suelo y los procesos de biodegradación de forma natural.
- b. **Ex situ:** Este procedimiento se realiza fuera del lugar donde está la contaminación, esto puede ser por tratamiento por vía sólida (tratamiento en lechos y por compostaje) y tratamiento por vía suspensión (se excava el material contaminado y se traslada a un reactor).
- **Landfarming:** Este proceso es trasladar el suelo a un área y estimular mediante variables con el objetivo de promover la actividad de los microorganismos, en donde se dan volteos para airear y se irriga con nutrientes, se debe tener en cuenta que el lugar donde se de este proceso deber ser adecuado para el manejo de aguas, lluvias y control de agua de escorrentía.
 - **Biopilas:** En este proceso se forma pilas con materiales biodegradables de diferentes dimensiones formadas por materia orgánica llamado compost y suelo contaminado, en las condiciones adecuadas para que se la degradación. Además, estas pilas están conformadas por un material aislante como las geomembranas para el control de lixiviados, aireándose de manera constante mediante volteos o con la colocación de tubos y la introducción de microorganismos y nutrientes de manera permanente.

- **Tratamiento de biosuspensión:** A este proceso también se le conoce como sistema biorreactor, donde se procede a excavar el suelo contaminado y luego es introducido a un reactor en donde se añade agua, nutrientes, y microorganismos convenientes para el proceso de degradación, con constantes volteos, posteriormente se paraliza los volteos para que los sólidos puedan separarse de los fluidos por el mecanismo de sedimentación y este sea separado y el suelo tratado vuelva a su lugar de procedencia.

1.2.10. Fundamentación bioquímica de la biodegradación

Comprende reacciones de óxido-reducción (Tabla 6) y como resultado final se obtiene la energía que es producido a partir de la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células. El proceso comienza con el sustrato orgánico que es el compuesto de hidrocarburo que es el dador de electrones, lo cual la actividad metabólica de la célula lo consume y lo degrada. El hierro (III), oxígeno, nitratos y dióxido de carbono son los aceptores más usados por los microorganismos. Al ser utilizado el oxígeno como aceptor de electrones; la respiración y la degradación se da en condiciones aeróbicas, mientras que al ser utilizado el dióxido de carbono o sulfatos; la degradación se produce en condiciones anaeróbicas (Ponce, 2014).

Tabla 6

Tipos de reacciones en los procesos de degradación aeróbicos y anaeróbicos

DEGRACIÓN AEROBIA	DEGRADACIÓN ANAEROBIA
Sustrato + O ₂ Biomasa + CO ₂ + H ₂ O	Sustrato + NO ⁻³ Biomasa + CO ₂ + N ₂
	Sustrato + SO ⁻² Biomasa + CO ₂ + S ₂
	Sustrato + Fe ³⁺ Biomasa + CO ₂ + Fe ₂
	Sustrato + Mn ⁺⁴ Biomasa + CO ₂ + Mn ⁺²
	Sustrato + CO ₂ Biomasa + CO ₂ + CH ₄

Fuente: Ponce (2014).

1.2.11. Principales factores importantes que condicionan la biodegradación microbiana de un suelo

Ponce (2014) indica que la biodegradación depende de diversos factores:

- a. **Microorganismos:** Las enzimas son las causantes de las transformaciones biológicas de los hidrocarburos y muchas de ellas ya presentes en el suelo. Cada enzima es específica con respecto a las reacciones que catalizan para cada compuesto, y en muchos casos se necesitan más de una para degradar una sustancia orgánica (Atlas, 1981; Rittman y McCarty, 2001, citados por Ponce, 2014, p. 22).
- b. **Temperatura:** Un factor esencial para el metabolismo de los microorganismos y para el proceso de biodegradación es la temperatura que debe fluir entre 20 °C y 30 °C para el crecimiento de estos microorganismos, puesto a que si la temperatura supera los 40 °C se da la desnaturalización de enzimas y a temperaturas inferiores a 0 °C se inhiben.
- c. **pH:** El pH óptimo para los procesos de degradación de biodegradación es neutro (pH 7,4 -7,8), para hongos es más ácido (pH 4 - 5). Para la reducción de pH del suelo se debe añadir azufre o compuestos de él. Se debe tener en cuenta que el pH afecta directamente al transporte de los metales pesados en suelo como también en la solubilidad del fósforo
- d. **Humedad:** El agua es un factor importante para el transporte de nutrientes y compuestos orgánicos que ayudan al ingreso hasta el interior de las células. Un nivel alto de humedad provocará la reducción de la concentración del oxígeno lo cual provocará la inhibición del crecimiento microbiano.
- e. **Nutrientes inorgánicos:** Los nutrientes principales requeridos son el nitrógeno y fósforo estos deben estar dentro del rango de C:N:P siendo 100:10:1 y otros nutrientes esenciales como Ca^{+2} , Na^+ , Fe^{+2} y SO_4^{-2} , estos son utilizados para la reproducción de los organismos (Maroto y Rogel, 2009).
- f. **Aceptores de electrones:** Los más utilizados por los microorganismos son: el oxígeno (O_2), como aceptor en la cadena transportadora de electrones que se da mediante la respiración en presencia de oxígeno; en donde como resultado se da la biodegradación aerobia, mientras que cuando se utiliza el sulfato (SO_4^{-2}) o dióxido de carbono (CO_2) se da en condiciones reductoras dando como resultado una biodegradación es anaerobia (Maroto y Rogel, 2009).

- g. Estructura del suelo:** La estructura del suelo es un factor importante, está formado por un material inorgánico (arena, limo y partículas arcillosas), materia orgánica, agua, gases y organismos vivos (lombrices, insectos, algas, bacterias, hongos, etc.) fundamentales para que se logre el intercambio continuo de moléculas mediante procesos físicos, químicos y biológicos (Rodríguez, 2013).
- h. Estructura del contaminante:** Las propiedades químicas y físicas de los contaminantes son fundamentales para que pueda ser biodegradado, puesto a que su solubilidad, naturaleza, grado de ramificación y saturación van a afectar el porcentaje de biodegradación.

1.2.12. Destino ambiental de hidrocarburos

Izquierdo (2013) indica que cuando el hidrocarburo es introducido en el suelo, se producen diferentes fenómenos físicos, químicos y biológicos (Figura 13) que se transforman, eliminan o transportan a otros compartimientos ambientales.

La evaporación, dilución, precipitación, reacciones bióticas (hidrólisis, oxidaciones químicas, etc.), biodegradación microbiana, bioacumulación y secuestro son procesos que se dan con estos contaminantes.

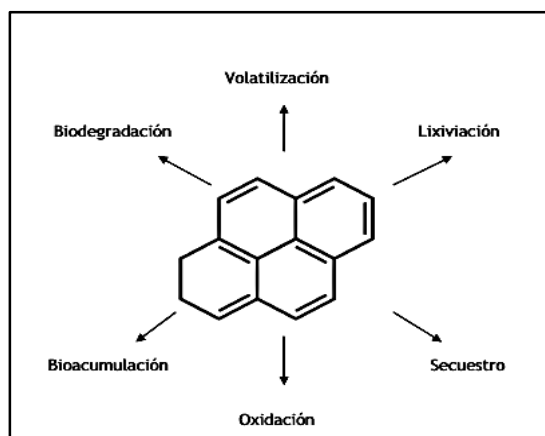


Figura 13. Afectación que sufre un contaminante en el ambiente. *Fuente:* Semple et al. (2003), citados por Izquierdo (2013, p. 17).

1.2.13. Biodegradación de hidrocarburos por microorganismos del suelo

Izquierdo (2013) indica que la degradación en presencia de oxígeno es más rápida y extensa, en donde los hidrocarburos son utilizados como fuente de carbono para el crecimiento por bacterias heterótrofas con metabolismo respiratorio aeróbico, lo cual implica una

degradación gradual de la molécula para formar al final uno o más fragmentos capaces de ingresar en el metabolismo central. Los procesos de degradación microbiana (Figura 14) pueden resumirse en los siguientes pasos:

- a. Se da la metabolización de los hidrocarburos por las células microbianas.
- b. Cuando el sustrato se encuentra dentro de la célula se da el proceso oxidativo, en donde se incorpora oxígeno al contaminante esto es llevado a cabo por la enzima peroxidasa y oxigenasa.
- c. Se da el ciclo del ácido tricarboxílico, convirtiendo a los hidrocarburos en intermediarios del metabolismo central.
- d. Se dan los procesos de biosíntesis de biomasa celular, mediante metabolitos como acetil-CoA, piruvato o succinato. Los azúcares utilizados para el crecimiento y para procesos biosintéticos son sintetizados por gluconeogénesis.

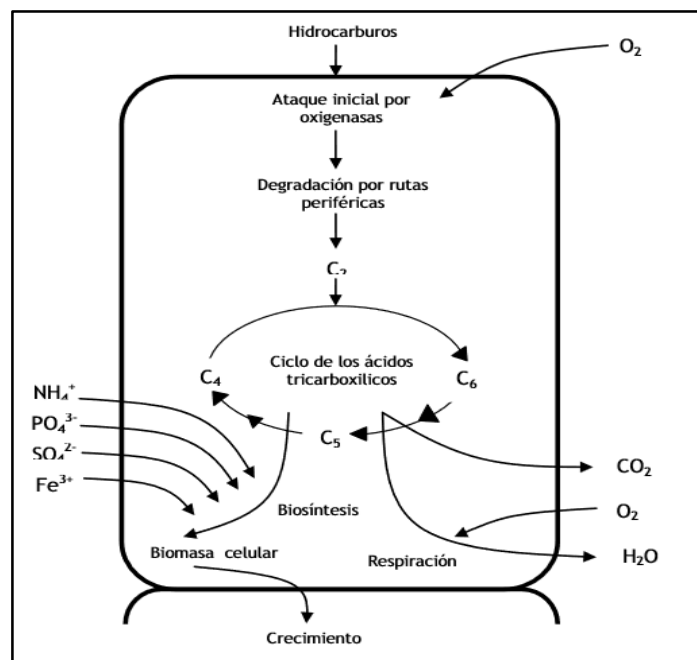


Figura 14. Degradación aerobia microbiana de hidrocarburos. Fuente: Fritsche y Hofrichter (2000), citado por Izquierdo (2013, p. 18).

Cuando la bacteria degradadora tiene las enzimas adecuadas, y como fuente de carbono el hidrocarburo, se produce la mineralización (la conversión de una parte de los elementos que

los integran en productos inorgánicos como CO₂ o H₂O). Cuando esta transformación no produce carbono para el crecimiento se habla de metabolismo.

Las reacciones enzimáticas producidas por los microorganismos son de mucha importancia para la degradación aerobia como los procesos de oxidaciones catalizadas por oxigenasas (mono y dioxigenasas) y peroxidasas.

1.2.14. Microorganismos degradadores de hidrocarburos

Izquierdo (2013) presenta la lista de bacterias Gram-negativas (Tabla 7) aisladas de suelos y sedimentos por su capacidad de utilizar HAPs como única fuente de carbono y energía.

Tabla 7

Lista de bacterias Gram-negativas aisladas de suelos y sedimentos por su capacidad de utilizar HAPs como única fuente de carbono y energía

Linaje	Género	Organismo	HAP (fuente de carbono y energía)	
<i>Alphaproteo bacteria</i>	<i>Paraco ccus</i>	<i>Paracoccus</i> sp. <i>Ophel</i>	Antraceno, criseno, fluoreno, fluoranteno y pireno.	
	<i>Sphing omonas</i>	<i>S. paucimobilis</i> E4PA	505	Fluoranteno, fluoreno, fenantreno, naftaleno, acenafteno, acenaftileno y/o criseno
		<i>S. paucimobilis</i> TNE12		
		<i>S. paucimobilis</i> BA2		
		<i>S. paucimobilis</i> ZX4		
		<i>S. paucimobilis</i> B1		
		<i>S. paucimobilis</i> R1		
		<i>S. paucimobilis</i> JAR02		
		<i>Sphingomonas</i> sp. A4		
		<i>Sphingomonas</i> sp. CHY-1		
		<i>Sphingomonas</i> sp. GY2B		
		<i>Sphingomonas</i> sp. KS14		
		<i>Sphingomonas</i> sp. LB126		
		<i>Sphingomonas</i> sp. P2		
		<i>Sphingomonas</i> sp. ZL5		

Linaje	Género	Organismo	HAP (fuente de carbono y energía)
	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Sinorhizobium</i> sp. C4	Fenantreno
Betaproteobacteria	<i>Ácidovorax</i>	<i>Ácidovorax</i> sp. NA3	Fenantreno
	<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes denitrificans</i> WW1	Fluoranteno, fenantreno
		<i>Alcaligenes faecalis</i> AFK2	
	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp. J2150	Naftaleno, antraceno y/o fenantreno.
		<i>Burkholderia</i> sp. C3	
		<i>Burkholderia</i> sp. RP007	
		<i>Burkholderia</i> sp. TNFYE-5	
	<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas testoteroni</i> GZ38A	Antraceno, fenantreno, y/o naftaleno.
		<i>Comamonas testoteroni</i> GZ39	
		<i>Comamonas testoteroni</i> GZ42	
	<i>Ralstonia</i>	<i>Ralstonia</i> sp. U2	Naftaleno
Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> PA-10	Fluoranteno, fenantreno, naftaleno y/o metilnaftalenos.
		<i>Pseudomonas saccharophila</i> P-15	
		<i>Pseudomonas Stutzeri</i> P-16	
	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophila</i> VUN 10,010	Benzo[a]antraceno, venzo[a]pireno, fluoranteno, pireno.
		<i>Stenotrophomonas maltophila</i> VUN 10,003	

Fuente: Koukkou y Vandera (2011), citados por Izquierdo (2013, p. 46).

1.2.15. *Pseudomonas* sp.

Las *Pseudomonas* pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae* dentro del orden *Pseudomonadales*, que además comprende la familia *Moraxellaceae*. Es un bacilo Gram

negativo aerobio, no formador de esporas y puede medir un diámetro de 0,5 a 1,0 μm a 1,5 a 5 μm de largo, son móviles por la presencia de uno o más flagelos polares. Este género utiliza un amplio rango de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos y pueden vivir en diversas condiciones ambientales. Son muy obicuos, tienen la capacidad de metabolizar compuestos orgánicos tóxicos, como hidrocarburos alifáticos y aromáticos. La mayoría de especies de este género son aeróbicas estrictas (Ruiz, 2007).

a. Clasificación y taxonomía

Las especies del género *Pseudomonas* se clasificaron dentro de cinco grupos basados en la homología del ARNr (Tabla 8). Posteriormente, a principios de los años 90, los miembros del grupo I se mantuvieron como pertenecientes al género *Pseudomonas*, pero las cepas adscritas a los grupos II, III, IV y V pasaron a considerarse como nuevos o preexistentes géneros (Palleroni y colaboradores, 1973, citado por Lacal, 2008, p. 5).

Tabla 8

Clasificación de las especies del género Pseudomonas

Grupos	Especies integrantes
I	<i>(Pseudomonas aeruginosa</i> Schroater, Migula.), <i>(Pseudomonas fluorescens</i> Migula), <i>(Pseudomonas putida</i> Migula), <i>(Pseudomonas chlororaphis</i> Guignard y Sauvageau, Bergey <i>et al.</i> , Peix <i>et al.</i>), <i>(Pseudomonas syringae</i> Van Hall), <i>(Pseudomonas cichorii</i> Swingle, Stapp), <i>(Pseudomonas stutzeri</i> Lehmann y Neumann, Sijderius), <i>(Pseudomonas mendocina</i> Palleroni), <i>(Pseudomonas alcaligenes</i> Monias), <i>(Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> Stanier), <i>(Pseudomonas agarici</i> Young), <i>(Pseudomonas fragi</i> Eichholz, Gruber), <i>(Pseudomonas synxantha</i> Ehrenberg, Holland), <i>(Pseudomonas taetrolens</i> Haynes), <i>(Pseudomonas mucidolens</i> Levine y Anderson), <i>(Pseudomonas oleovorans</i> Lee y Chandler), <i>(Pseudomonas resinovorans</i> Delaporte <i>et al.</i>)
II	<i>(Pseudomonas cepacia</i> Palleroni and Holmes), <i>(Pseudomonas gladioli</i> Severini), <i>(Pseudomonas caryophylli</i> Burkholder, Starr y Burkholder), <i>(Pseudomonas alcaligenes</i> Monias), <i>(Pseudomonas pseudomallei</i> Whitmore, Haynes), <i>(Pseudomonas mallei</i> Zopf, Redfeam <i>et al.</i>), <i>(Pseudomonas solanacearum</i> Smith), <i>(Pseudomonas pickettii</i> Ralston), <i>(Pseudomonas pyrrocinia</i> Imanaka <i>et al.</i>), <i>(Pseudomonas andropogonis</i> Smith, Stapp).
III	<i>(Pseudomonas testosteroni</i> Marcus y Talalay), <i>(Pseudomonas saccharophila</i> Doudoroff), <i>(Pseudomonas facilis</i> Schatz y Bovell, Davis), <i>(Pseudomonas delafieldii</i> Davis), <i>(Pseudomonas palleronii</i> Davis)

Grupos	Especies integrantes
IV	(<i>Pseudomonas diminuta</i> Leifson y Hugh), (<i>Pseudomonas vesicularis</i> Busing <i>et al.</i> , Galarneault y Leifson)
V	(<i>Pseudomonas maltophilia</i> ex Hugh y Ryschenkow, Hugh), (<i>Pseudomonas geniculata</i> Wright, Chester)

Fuente: Lacal (2008).

1.2.16. *Pseudomonas fluorescens*

Estas bacterias presentan las siguientes características: flagelos polares, baciliformes y aerobias. Las *Pseudomonas fluorescens* están en contacto en los nódulos de las plantas lo cual estimula el crecimiento de la planta (Madigan y Martinko, 2005, citados por Pérez *et al.*, 2015, p. 226); estas bacterias producen metabolitos como sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles, enzimas y fitohormonas (Showkat *et al.*, 2012, citados por Pérez *et al.*, 2015, p. 226).

1.2.17. Vías de degradación de los hidratos de carbono

Para la degradación de hidratos de carbono, las bacterias presentan tres vías: la vía glucolítica o de Embden Meyerhof Parnas (Figura 15), y la vía de Entner-Doudorof y la vía de pentosa fosfato(Figura 16); con respecto a la degradación de la glucosa las bacterias del género *Pseudomonas* utilizan la vía de Entner-Doudoroff, dando como resultado la formación de una molécula de ATP, por cada molécula de glucosa degradada (Varela, 2011, citado por Muñoz, 2016, p. 18).

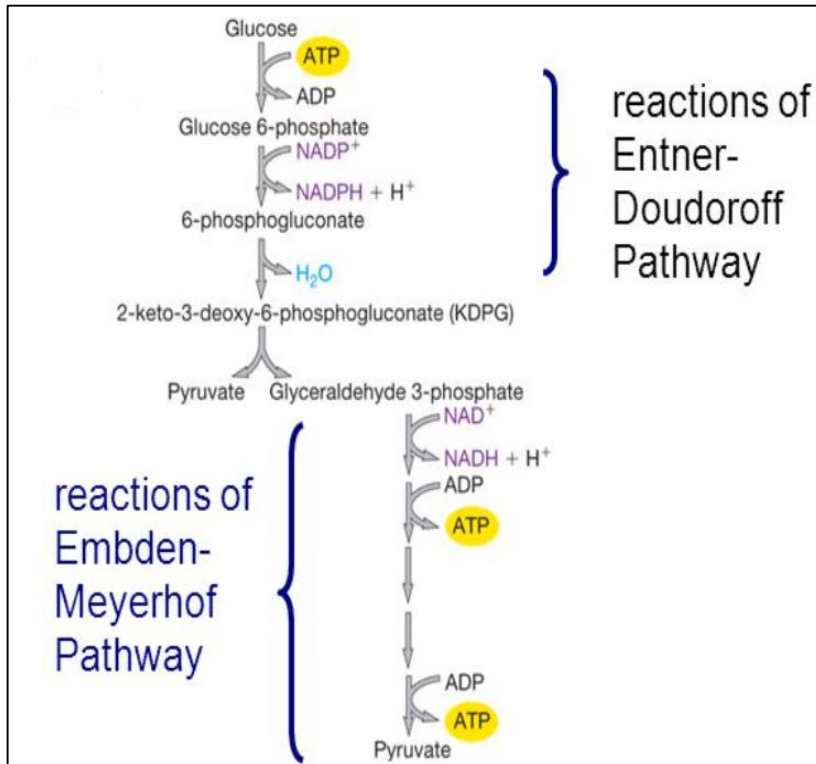


Figura 15. Vía de Entner-Doudoroff y Embden Meyerhof Parnas en donde se degrada el hidrato de carbono. Fuente: SlidePlayer (2015).

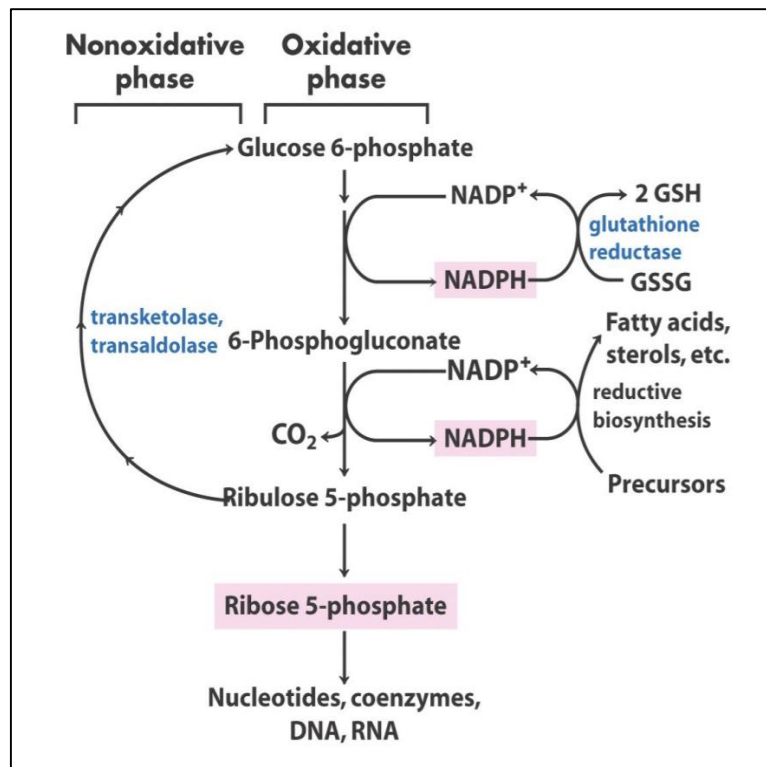


Figura 16. Vía glucolítica (pentosa fosfato) donde se degrada el hidrato de carbono. Fuente: SlidePlayer (2015).

Las bacterias tienen la capacidad de producir biosurfactantes, que participan en la extracción de aceite y sus derivados, contribuyendo así el ingreso del hidrocarburo en la pared celular. También contienen plásmidos catabólicos que incluyen genes que codifican las enzimas para el proceso de degradación, también contienen transposones, plásmidos y operones; los cuales ayudan en el traspaso de genes logrando así que se puedan adaptar a ambientes contaminados (Gómez *et al.*, 2008).

1.2.18. Capacidad biosurfactante de microorganismos

Los microorganismos producen biosurfactantes que se unen a componentes celulares o son excretados extracelularmente, esto se da durante el crecimiento en sustratos inmiscibles en agua (Camilios *et al.*, 2008).

Los biosurfactantes muestran una gran variedad, de naturaleza química y de alto y bajo peso molecular; estos están compuestos de polisacáridos, proteínas, liposacáridos, lipoproteínas, etc. (Mulligan, 2005, citado por Di Martino, 2015, p. 27). Los surfactantes de alto peso molecular llamados también bioemulsionantes, puesto a que forman y estabilizan aceite en agua o agua en emulsiones de aceite, pero no todos son eficientes en la reducción de la tensión superficial (Figura 17), y a la vez estos bioemulsionantes son eficientes en bajas concentraciones y presentan una especificidad de sustrato (Fracchia *et al.*, 2012, citados por Di Martino, 2015, p. 27).

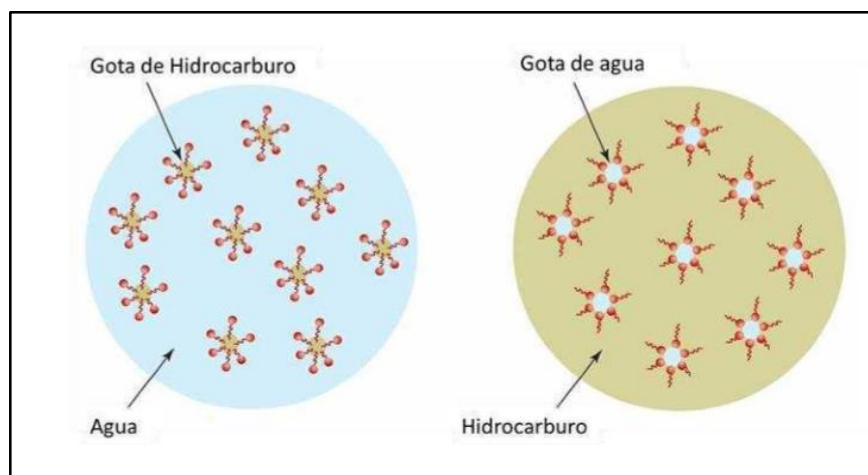


Figura 17. Esquema de acción emulsificante de algunos biosurfactantes de alto peso molecular. Fuente: Di Martino (2015, p. 28).

Di Martino (2015) indica las funciones que tienen estos surfactantes a la hora de aumentar la biodisponibilidad son las siguientes:

- a. Disminuye la tensión superficial, reduce la tensión interfacial y aumenta la solubilidad.
- b. Disipa el petróleo crudo aumentando la superficie de contacto.
- c. Incrementa la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos por dos métodos: la solubilización y por movilización.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño de la investigación

La presente investigación presentó un diseño descriptivo y explorativo. Así mismo, presentó un enfoque cuantitativo en donde se recogieron y analizaron datos cuantitativos sobre determinadas variables estudiando la asociación o relación entre variables, cuantificándose y determinándose la asociación entre variables, y la veracidad de los resultados de una muestra con el objetivo de concluir resultados a partir de la población de donde procede la muestra (Palella y Martins, 2012).

2.2. Lugar y fecha

2.2.1. Muestreo de raíces

El muestreo de raíces para el aislamiento de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* de la presente investigación fueron colectadas en la hacienda Casa Blanca ubicada en del distrito de Pachacámac en las coordenadas UTM-WGS84 297223,86 m E - 8650318.79 m S. (Figura 18).

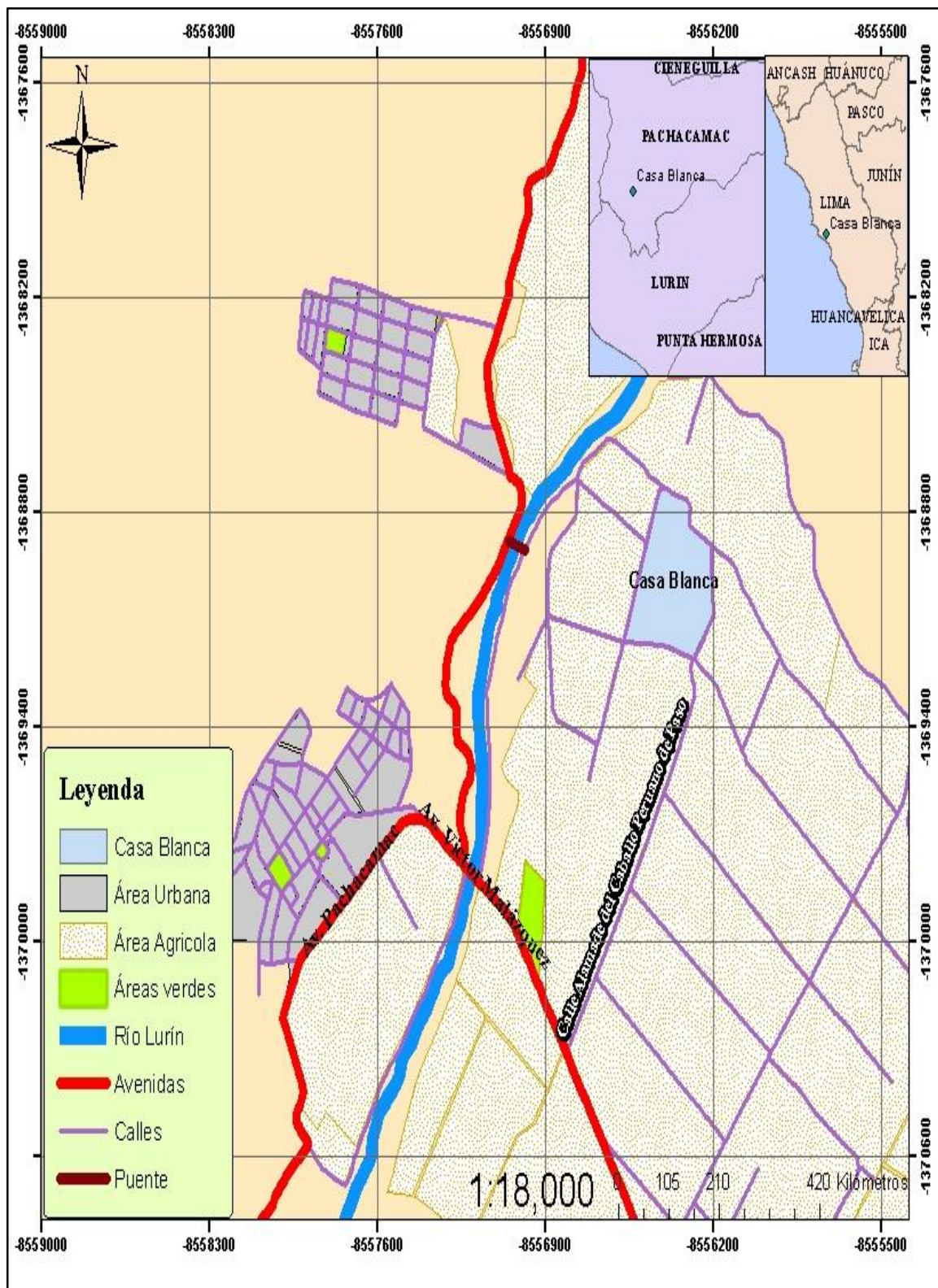


Figura 18. Mapa del distrito de Pachacámac. Fuente: Elaboración propia.

2.3. Materiales

2.3.1. Material Biológico

Raíces de plantas (frijol, yuca y arracacha) provenientes del cultivo de la hacienda Casa Blanca, Pachacamac y tierra marca tierra preparada de Sodimac.

2.3.2. Medio de Cultivo

Agar King B, Agar Nutritivo, Agar Citrato de Simons, Agar Gelatina, Caldo Urea, Agar Mio, medio Mineral y medio Mínimo de Goldman con extracto de levadura al 3 %.

2.3.3. Reactivos

Peróxido de hidrogeno al 3 %, reactivo Kovacs, ácido clorhídrico al 1 %, Solución de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1M, soluciones de buffer de pH de siete y diez, agua destilada, agua desionizada, hidróxido de sodio 0,10 N, cristal violeta, acetona, lugol, safranina, alcohol etílico al 99 %, ácido sulfúrico.

2.3.4. Equipos

Autoclave marca Kyntel, lámpara luz UV, Cámara de aislamiento de marca Kyntel, Incubadora Lab modelo ODHG-9070, Balanza digital marca Electronic Balance, pH metro digital marca Kyntel modelo pH-016, contador de colonias digital, baño María marca Kert Lab modelo CDK-S22, balanza electrónica modelo SF-400, Microscopio binocular marca Labor Tech modelo 2005, Microscopio binocular marca Labor Tech modelo 2005, Horno microondas marca LG, centrifuga para tubos marca Kert Lab modelo 0412-1, Espectrofotómetro marca Kert Lab modelo SpectrumLab 54, Vortex mixer marca Kyntel, pH-metro digital Hanna pHep 4 (HI 98127) Waterproof. WTW pHotoFlex ®, equipo Soxhlet.

2.3.1. Otros materiales

Crudo de petróleo recogida de Corvina crude oil de la Refinería de Talara, láminas portaobjetos, mortero, placas Petri, mechero, gradilla, piceta, pipetas automáticas, asa de Drigalsky, tubos de ensayo, probeta de 500 ml, matraces de 250 ml, papel filtro, palillos de madera, asa de siembra, mascarilla, guantes, Cooler, cajas de madera, pulverizador, bolsas ziploc, papel, de toalla, botellas de vidrio.

2.4. Descripción de la investigación

El proceso de aislamiento, caracterización microbiológica y bioquímica de la rizósfera de cultivos de frijol, yuca y arracacha, fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología, mientras que las instalaciones de los tratamientos experimentales fueron llevadas a cabo en el invernáculo de la Universidad Católica Sedes Sapientiae-Sede Lima. Los análisis de cuantificación del compuesto oleoso por el método Soxhlet se realizó en el laboratorio de Ciencias Básicas de la Filial Huaura: Végueta de la UCSS. El experimento se detalla en el siguiente flujograma (Figura 19).

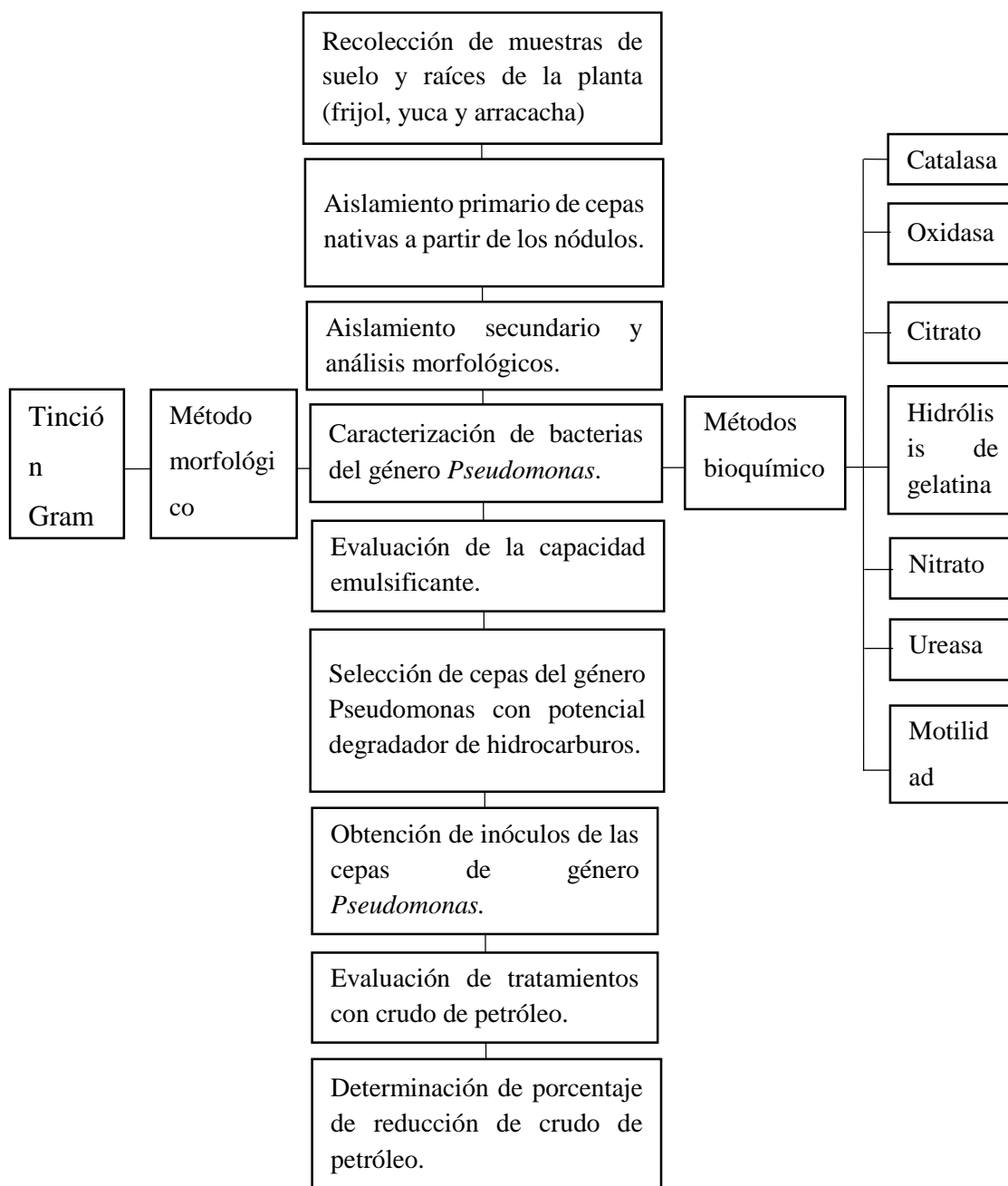


Figura 19. Etapas del experimento. Fuente: Elaboración propia.

2.4.1. Recolección de muestras de suelo y raíces de la planta (frijol, yuca y arracacha)

Para la presente investigación se recolectaron raíces de las plantas de frijol, yuca y arracacha (Figura 20) en las parcelas de cultivo de la hacienda Casa Blanca. Según la metodología de Caviedes (2010), se tomaron raíces sanas sin presencia de pesticidas en una profundidad no mayor a 15 cm. Las muestras colectadas se almacenaron en bolsas ziploc debidamente rotuladas y fueron transportadas en un cooler a temperatura de 4 °C hasta el Laboratorio de

Microbiología y Biotecnología de la Universidad Católica Sedes Sapientiae. Se emplearon muestras de suelo de la marca “Tierra preparada” comprada en Sodimac y para su caracterización (ver Apéndice 20) fueron llevadas para su análisis al Laboratorio de Agua, suelo, medio ambiente y fertiriego de la Universidad Nacional Agraria la Molina.



Figura 20. Recolección de muestras de raíces de frijol, yuca y arracacha.
Fuente: Elaboración propia.

2.4.2. Recolección de la muestra de crudo de petróleo

La muestra de crudo de petróleo (Figura 21) fue recogida de la muestra de Corvina crude oil de la Refinería de Talara el 01 de marzo del 2015 de la empresa BPZ EQP SRL/Pacific Rubiales, con las siguientes características (ver Apéndice 22).

Almora (2014) estudió la compatibilidad para la mezcla de petróleos crudos como carga a unidades de procesos en refinería Talara, en donde la muestra de crudo de corvina fue caracterizada empleando los siguientes métodos: Densidad y gravedad API (por el método del hidrómetro), agua y sedimentos (por el método de centrifugación), viscosidad cinemática y contenido de azufre (por espectrofotometría de fluorescencia de rayos por energía dispersiva), como de manera complementaria se obtuvo información de la Unidad Laboratorio de Refinería Talara que tiene información de evaluaciones de crudos (ver Apéndice 23). Este crudo corvina es considerado como un crudo mediano, puesto a que contiene un grado API entre 22,0 hasta 29,9. Este crudo es procesado para hacer gasolina, queroseno y el gasóleo de alta calidad.



Figura 21. Recolección de muestra de crudo de petróleo.

2.4.3. Aislamiento primario de la cepa de bacterias del género *Pseudomonas fluorescens*

Se aislaron bacterias del género *Pseudomonas* a partir de nódulos de raíces de frijol, yuca y arracacha según la metodología de Uribe *et al.* (1999). Se realizaron lavados sucesivos con una solución de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1M hasta retirar todos los restos de suelo. Luego fueron trituradas en un mortero previamente esterilizado hasta obtener un líquido. A partir del líquido obtenido de cada raíz, se procedió a realizar diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-7} (Figura 22) y 1 ml de cada dilución fue sembrado por dispersión en placas Petri con medio de cultivo agar King B (medio selectivo para *Pseudomonas* para aislamiento, diferenciación y detección de la especie por la producción de la fluoresceína) (Tabla 9). Todos los medios de cultivo y los materiales empleados para el aislamiento fueron preparados bajo condiciones asépticas de esterilización en autoclave (101 kPa, durante 15 minutos). Los parámetros de incubación del cultivo fueron a una temperatura de 28 °C por un periodo de 24 h. Las placas Petri con los aislamientos primarios fueron observadas bajo una lámpara de luz ultravioleta (366 nm), en donde se fueron seleccionando aquellas que presentaron fluorescencia.



Figura 22. Aislamiento primario de cepas nativas presentes en los nódulos de las raíces de frijol, yuca y arracacha. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9

Composición del medio Agar King B

Elementos	Cantidad
Tripteína	10 g/L
Peptona de carne	10 g/L
Fosfato dipotásico	1,5 g/L
Sulfato de magnesio	1,5 g/L
Agar	15 g/L
pH final	7,2 ± 0,2

Fuente: Ficha técnica del Medio King B - Condalab

2.4.4. Aislamiento secundario (purificación de bacterias)

Se realizó un aislamiento secundario mediante la metodología de Caviedes (2010) para la purificación de las bacterias del género *Pseudomonas*, mediante el subcultivo de las placas sembradas y seleccionadas del aislamiento primario en medio Agar King B. Los subcultivos fueron incubados a una temperatura de 28 °C por un periodo de 24 h, este fue preparado bajo condiciones asépticas de esterilización en autoclave (101 kPa, durante 15 minutos).

Para la selección secundaria se tuvo la siguiente consideración: descartar la presencia de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, en las placas mediante observación de las colonias bajo una lámpara de luz ultravioleta (366 nm). Se seleccionaron aquellas que mostraron un mayor

crecimiento y emisión de fluorescencia (Figura 23), y se descartaron aquellas que presentaron una pigmentación azul/verde o marrón rojiza, puesto a que eran considerados como positivos para la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

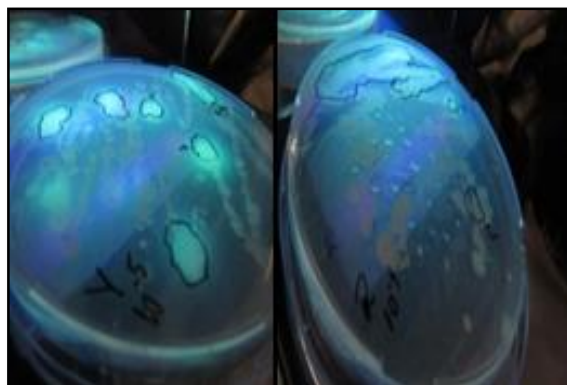


Figura 23. Selección de bacterias *Pseudomonas* con características de *Pseudomonas fluorescens*. Fuente: Elaboración propia.

2.4.5. Caracterización de bacterias del género *Pseudomonas* mediante métodos microbiológicos y bioquímicos convencionales

Se realizó la caracterización de la morfología bacteriana mediante la observación de la estructura de la pared celular mediante la metodología de tinción de Gram (Ulloa, 2011), tal como se aprecia en la Figura 24.

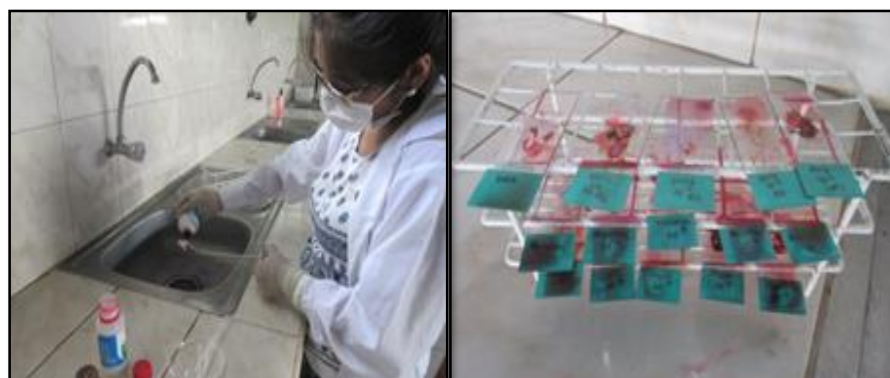


Figura 24. Tinción de Gram de la bacteria aislada. Fuente: Elaboración propia.

Fernández *et al.* (2010) describen que las diferentes pruebas bioquímicas permiten determinar características metabólicas de las bacterias en estudio. Algunas de las pruebas para la lectura de su crecimiento del microorganismo son rápidas puesto a que en unas horas puedes ver el resultado mientras que en otras requieren un periodo de incubación previa entre

24 a 48 horas, estas pruebas se demoran más tiempo, puesto a que, detectan componentes metabólicos de un microorganismo, a un medio sembrado de identificación, que contienen el sustrato a metabolizar.

Las pruebas bioquímicas que permitieron la identificación de bacterias del género *Pseudomonas* se realizaron según lo descrito por Prescott *et al.* (2004), estas fueron pruebas de galería corta (catalasa, oxidasa, citrato, hidrólisis de gelatina, ureasa y motilidad).

a. Catalasa

Esta enzima se encuentra en las bacterias anaerobias facultativas y aerobias, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es uno de los sustratos que se da en la degradación de azúcares, descomponiéndose agua y oxígeno.

Para esta prueba se extrajo con un asa de siembra una muestra de la bacteria aislada y se colocó sobre una lámina portaobjeto, luego se añadió dos gotas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3 % (ver Apéndice 24). Finalmente se observó la reacción: positivo (formación de burbujas) o negativa (no hay presencia de burbujeo).

b. Oxidasa

Este tipo de pruebas determina la enzima oxidasa, la reacción de esta enzima se debe a la presencia del sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo (el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno, esto depende del microorganismo). El aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones es el oxígeno.

Para esta prueba se subcultivaron colonias de placas previamente seleccionadas en medio Agar Nutritivo. Se tomó una porción de la colonia y se depositó con la ayuda de un palillo de madera esterilizado en una lámina de portaobjeto que contenía una fracción de papel filtro. Posteriormente se dejó caer una gota del reactivo Kovacs (p-dimetil amino

benzaldehído) sobre la lámina conteniendo la muestra bacteriana (ver Apéndice 24), se esperó 5 segundos para la observación del resultado: positivo (muestra una coloración azul-violeta), indicando la presencia del citocromo oxidasa y negativa (sin viraje de color).

c. Citrato

Con esta prueba se determina si el microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo.

Para esta prueba, se elaboró una batería de tubos de ensayo con agar Citrato de Simons en pico de flauta. La siembra se realizó por estriado y se incubó por un tiempo de 24 horas a una temperatura de 32 °C (ver Apéndice 24). El resultado da positivo si la muestra crecimiento presenta un color azul en el pico, mientras que es negativo cuando no hay crecimiento y viraje de color.

d. Hidrólisis de gelatina

Con esta prueba identificamos la capacidad de los microorganismos pueden hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos, mediante la acción de las enzimas específicas denominadas gelatinasas.

Para esta prueba se preparó Agar gelatina (proteína) en placas y se realizó el sembrado de las bacterias en forma de estrías. Se incubo por un tiempo de 24 horas a una temperatura de 32 °C. Posteriormente se inundó la placa con ácido clorhídrico a 1 % (ver Apéndice 24). Se considera positivo cuando hay presencia de un precipitado blanco, y si es negativo no se muestra nada.

e. Ureasa

Esta prueba determina la capacidad que tiene el microorganismo de desdoblar la urea y así formar dos moléculas de amoniaco por la acción de la enzima ureasa.

Para esta prueba se preparó el caldo urea y se distribuyó en tubos de ensayo. Se inoculó con la ayuda del asa de siembra una porción de colonia del aislado bacteriano. Se incubó por un tiempo de 24 horas a una temperatura de 32 °C (ver Apéndice 24). Se considera positivo cuando el caldo de color amarillo cambia a color rojo-rosado, mientras que es negativo cuando no muestra ningún cambio.

f. Motilidad

Esta prueba determina la capacidad del microorganismo de moverse por la presencia de sus flagelos.

Para esta prueba se preparó el medio agar MIO en donde se distribuyó en tubos de ensayo y con ayuda de un asa de siembra se tomó una porción del aislado bacteriano y se hizo una punción en la parte central del agar contenido en el tubo de ensayo. Se incubó por un tiempo de 24 horas a una temperatura de 32 °C (ver Apéndice 24). Se considera positivo cuando los microorganismos móviles migran a la línea de siembra y se difunden en el medio, mientras que cuando es negativo no se muestra migración.

2.4.6. Selección de bacterias del género *Pseudomonas* con potencial degradador de hidrocarburos.

Para la adaptación y evaluación de la actividad degradativa (ver Apéndice 25) de los aislados bacterianos caracterizados como *Pseudomonas fluorescens*, se preparó el medio de cultivo Mineral a un pH final de 7,0 según la metodología de Mills *et al.* (1978), citados por Samanaez, 2008, p. 20), suplementado con crudo de petróleo como única fuente de carbono en diferentes concentraciones al 0 %, 1 % (0,1 ml), 2 % (0,2 ml), 3 % (0,3 ml), 4 % (0,4 ml) y 5 % (0,5 ml) (Figura 25). Se inoculó 1 ml de *Pseudomonas fluorescens* provenientes de Caldo Nutritivo sobre la batería de tubos de ensayo conteniendo las diferentes concentraciones de crudo de petróleo en medio Mineral. Posteriormente la batería de tubos fue incubada a 32 °C en condiciones estáticas entre 5 y 15 días. Finalmente se evaluó mediante tinción de Gram las bacterias adaptadas a las diferentes concentraciones de crudo de petróleo. El criterio que se tomó para elegir la concentración de crudo de petróleo para la evaluación fue a partir del comportamiento del crecimiento (supervivencia y

bioaumentación) de la bacteria y tolerancia al crudo, eligiéndose, así como mayor adaptabilidad a una dosis de 5 % de crudo de petróleo.

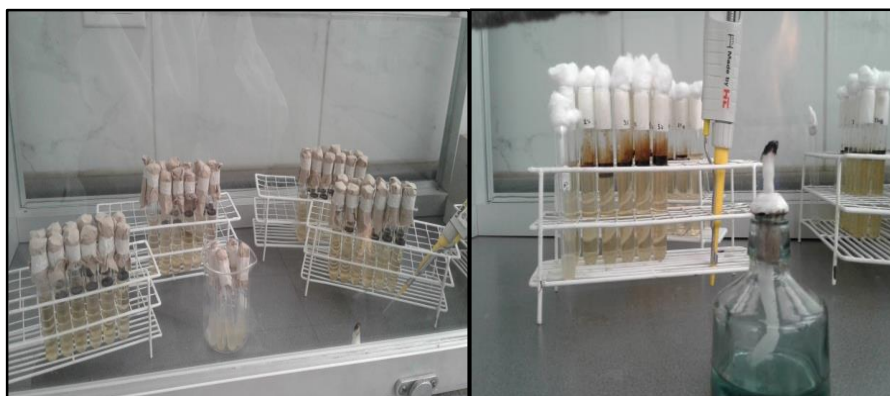


Figura 25. Adaptación de la bacteria *Pseudomonas* seleccionadas a diferentes concentraciones con crudo de petróleo. *Fuente:* Elaboración propia.

2.4.7. Evaluación de la capacidad emulsificante de las cepas seleccionadas con potencial degradador de hidrocarburos.

Para la evaluación de la capacidad emulsificante (ver Apéndice 26), se siguió la metodología de Goldman y col. (1982), citado por Samanaez (2008, p. 20), en donde se reactivaron las bacterias en 2 ml en Caldo Nutritivo y fueron incubadas a 32 °C por 24 horas. Se preparó el medio Mínimo de Goldman con extracto de levadura al 3 % que fue esterilizado en autoclave (101 kPa, durante 15 minutos), e incubados a 28 °C por 24 horas, excepto el etanol. Bajo condiciones axénicas se agregó 18 ml de medio Mínimo de Goldman en matraces de 25 ml, y luego se adicionó 2 ml de cultivo por cada aislado bacteriano. Se incubó a 32 °C durante 72 horas, transcurrido el tiempo se centrifugó el cultivo a 5000 rpm. por 30 minutos. Posteriormente se recolectó 10 ml del sobrenadante, previa decantación y se agregó a cada tubo 0,2 ml de crudo de petróleo para ser agitado manualmente durante 5 minutos. Por último, se trasvasó 2 ml de la preparación anterior a cubetas descartables para la lectura de absorbancia a 540 nm, el blanco correspondió al medio de cultivo sin inoculación (Figura 26). Los resultados obtenidos fueron convertidos a unidad de actividad emulsificante por ml (UAE/ml), siendo 0,816 de absorbancia equivalente a una unidad de actividad emulsificante/ml.

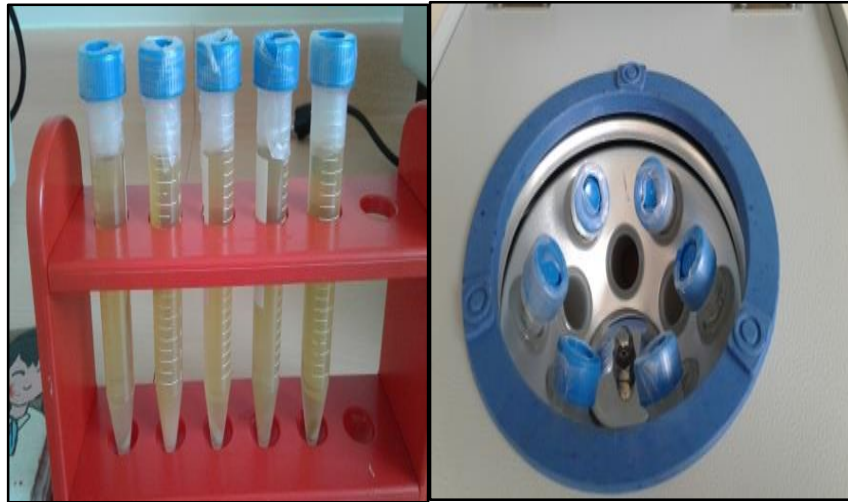


Figura 26. Preparación de las cepas seleccionadas para la evaluación de la capacidad emulsificante. *Fuente:* Elaboración propia.

2.4.8. Obtención del inóculo de las cepas seleccionadas del género *Pseudomonas fluorescens* por bioaumentación.

Para el proceso de bioaumentación (ver Apéndice 27) se siguió la metodología de Samanaez (2008), las cepas ya adaptadas fueron sembradas en Agar King B. La cantidad de colonias fueron expresadas en UFC/ml (ver Apéndice 21). Se reactivaron las bacterias en 1,5 ml de caldo nutritivo, luego se incubaron a una temperatura de 32 °C durante 24 horas. Los cultivos, nuevamente fueron inoculados en 10 ml de medio Mineral (Tabla 10), el mismo que contenía crudo de petróleo como única fuente de carbono al 5 % (según metodología para bioaumentación). Posteriormente estos 10 ml fueron inoculados en 100 ml de medio Mineral más crudo de petróleo al 5 %.

Finalmente se realizó este mismo proceso para cada una de las cepas obtenidas de las raíces de frijol, yuca y arracacha hasta alcanzar un volumen total de 100 ml para cada unidad experimental de cada tratamiento (ver Apéndice 23).

Tabla 10

Composición del medio mineral

Elementos	Cantidad
ClNa	24 g
ClK	0,70 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Mg SO ₄ .7H ₂ O	1 g
Na ₂ HPO ₄	3 g
NH ₄ NO ₃	3 g
Agua destilada	1000 ml
Petróleo crudo	10 ml

Fuente: Mills y Col. (1978), citado por Samanez (2008, p. 76).

2.4.9. Evaluación de las cepas seleccionadas pertenecientes al género *Pseudomonas* en los tratamientos con crudo de petróleo al 3 % y 5 % durante 30 y 60 días

La instalación de los tratamientos experimentales se distribuyó en compartimientos de madera con una dimensión de 30 x 30 cm. Se cubrió con plástico grueso de color negro cada compartimiento con la finalidad de evitar la filtración al suelo. Se añadió 1 kg de suelo tamizado y esterilizado para cada tratamiento con sus respectivas repeticiones. Luego se inoculó 100 ml de la cepa bioaumentada en cada tratamiento, y el contaminante: 3 % y 5 % de crudo de petróleo. Todas las unidades experimentales fueron homogenizadas y colocadas en el invernáculo y mantenidas a temperatura ambiente durante un periodo de 60 días (Figura 27).



Figura 27. Establecimiento de los tratamientos en el invernáculo. *Fuente:* Elaboración propia.

2.5. Tratamientos experimentales

Los tratamientos experimentales se especifican en la Tabla 11.

Tabla 11

Descripción de los tratamientos experimentales

Tratamiento	Composición
TC*	1 kg de SSE + 3 % de petróleo + 30 días
TC	1 kg de SSE + 3 % de petróleo + 60 días
TC	1 kg de SSE + 5 % de petróleo + 30 días
TC	1 kg de SSE + 5 % de petróleo + 60 días
T1	1 kg de SE + 100 ml de IPF de frijol + 3 % de petróleo + 30 días
T1	1 kg de SE + 100 ml de IPF de frijol + 3 % de petróleo + 60 días
T2	1 kg de SE + 100 ml de IPF de frijol + 5 % de petróleo + 30 días
T2	1 kg de SE + 100 ml de IPF de frijol + 5 % de petróleo + 60 días
T3	1 kg de SE + 100 ml de IPF de yuca+ 3 % de petróleo + 30 días
T3	1 kg de SE + 100 ml de IPF de yuca+ 3 % de petróleo + 60 días
T4	1 kg de SE + 100 ml de IPF de yuca+ 5 % de petróleo + 30 días
T4	1 kg de SE + 100 ml de IPF de yuca+ 5 % de petróleo + 60 días
T5	1 kg de SE + 100 ml de IPF de arracacha + 3 % de petróleo + 30 días
T5	1 kg de SE + 100 ml de IPF de arracacha + 3 % de petróleo + 60 días
T6	1 kg de SE + 100 ml de IPF de arracacha + 5 % de petróleo + 30 días
T6	1 kg de SE + 100 ml de IPF de arracacha + 5 % de petróleo + 60 días

IPF=Inóculo de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, SE= Suelo esterilizado. SSE: Suelo sin esterilizar.
Fuente: Elaboración propia.

Los tratamientos fueron aplicados durante 30 y 60 días evaluándose cada semana, bajo condiciones descritas en la Tabla 12. A cada tratamiento y control se le aplicó cuatro réplicas. El tratamiento uno (T1), estuvo formado por 1 kg de suelo esterilizado contaminado con 3 % de crudo de petróleo más 100 ml de inóculo bacteriano aisladas de la raíz de frijol. El tratamiento dos (T2), estuvo formado por 1 kg de suelo esterilizado contaminado con 5 % de crudo de petróleo más 100 ml de inóculo bacteriano aisladas de la raíz de frijol. El tratamiento 3 (T3), estuvo formado por 1 kg de suelo esterilizado contaminado con 3 % de crudo de petróleo más 100 ml de inóculo bacteriano aisladas de la raíz de yuca. El tratamiento 4 (T4), estuvo formado por 1 kg de suelo esterilizado contaminado con 5 % de crudo de petróleo más 100 ml de inóculo bacteriano aisladas de la raíz de yuca. El tratamiento 5 (T5), estuvo formado por 1 kg de suelo esterilizado contaminado con 3 % de crudo de petróleo más 100 ml de inóculo bacteriano aisladas de la raíz de arracacha. El

tratamiento 6 (T6), estuvo formado por 1 kg de suelo esterilizado contaminado con 5 % de crudo de petróleo más 100 ml de inóculo bacteriano aisladas de la raíz de arracacha. El tratamiento control (TC*) y (TC) estuvo conformado por 1 kg de suelo sin esterilizar contaminado con 3 % y 5 % de crudo de petróleo respectivamente sin inoculación bacteriana.

Tabla 12

Condiciones experimentales para los tratamientos: TC, TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6*

Características del experimento	Descripción
Duración	60 días
Temperatura	28 ± 1 °C
Aireación	Interdiario
Volumen	1 kg
Riego	Interdiario
N° de repeticiones	cuatro

Fuente. Elaboración propia.

2.6. Unidades experimentales

En la investigación se consideraron 32 unidades experimentales (Figura 28), cada compartimiento de madera estuvo conformado una base de plástico negro de capacidad de 2 kg, que contenía 1 kg de suelo agrícola esterilizado, más 3 % (3 ml) y 5 % (5 ml) de crudo de petróleo y 100 ml de la cepa adaptada bioaumentada, evaluadas a los 30 y 60 días. Los tratamientos estuvieron ubicados en el invernáculo de la Universidad Católica Sedes Sapientiae de la sede de Gonzales Prada, Lima.



Figura 28. Distribución de los tratamientos. *Fuente:* Elaboración propia.

2.7. Identificación de variables y su mensuración

2.7.1. Medición del potencial de hidrógeno (pH) para cada tratamiento

Para la medición del pH se realizó la calibración del equipo, haciendo uso de las soluciones buffer de 4 y 7 unidades de pH. La medición se llevó a cabo, haciendo uso del pH-metro digital Hanna pHep 4 (HI 98127) Waterproof (Figura 29), que permitió realizar las lecturas directas en los tratamientos, de manera semanal durante un periodo de 60 días.

Para realizar la medición, se extrajo 1 g de suelo de cada tratamiento y se colocó en un vaso descartable con 10 ml de agua desionizada, en donde se removió y se dejó reposar 10 minutos, para luego hacer la medida en donde se mantuvo insertado el pH-metro por un periodo de 10 segundos, para comprobar si existía variación entre los datos.

Finalmente, la limpieza del sensor se realizó con 3 ml de agua desionizada después del término de cada medición.



Figura 29. Medición de pH a cada una de las unidades experimentales.
Fuente: Elaboración propia.

2.7.2. Para la medición de NPK

Para la medición de NPK de las muestras de suelo de cada tratamiento se procedió de la siguiente manera:

Los análisis de NPK se realizaron con el equipo WTW pHotoFlex®, posee una combinación de mediciones fotométricas con turbidez y pH (las muestras debe pasar por un pretratamiento) por lo cual para su medición en esta presente investigación se realizó un pretratamiento a las muestras a evaluar con la siguiente metodología: Se pesó 1 g de muestra de suelo y se procedió a hacer el filtrado con el solvente (Alcohol etílico al 99 %) en papel filtro hasta que el agua filtrada en esa muestra de suelo quede ligeramente transparente, eliminando así todo rastro de crudo de petróleo (Figura 30), luego fue secado y llenado en una cubeta de vidrio en donde se añadió 10 ml de agua destilada más 2 ml de ácido sulfúrico para ser llevado al horno por 30 minutos en una temperatura de 60 °C, y posteriormente ser filtrado por segunda vez, y así obtener la muestra preparada para cada una de las mediciones de NPK.



Figura 30. Filtración del suelo con Alcohol Etílico. *Fuente:* Elaboración propia.

- **Medición de Nitrógeno**

El análisis de nitrógeno se efectuó mediante la técnica de fotometría con el equipo WTW pHotoFlex® (ver Apéndice 30), mediante la metodología de (Merck, 2005, citado por Silva, 2014). El principio aplicado en esta metodología para la determinación de nitrógeno total se da mediante la oxidación alcalina que convierte los compuestos de nitrógeno orgánico e

inorgánico a nitrato mediante la digestión de Koroleff (peroxodisulfato), estos iones nitrato reaccionan en una disolución de ácido sulfúrico formando un derivado del ácido benzoico en nitrocompuesto rojo que es determinado fotométricamente.

Se tomó una muestra de 10 ml, se añadió una microcuchara azul del Reactivo N-1K y se mezcló, luego se añadió seis gotas del reactivo N-2K y se cerró firmemente y se mezcló. Posteriormente, se introdujo las cubetas a un horno a 120 °C por 1 hora, después se dejó enfriar 10 minutos y se agitó brevemente la cubeta, para luego añadir una microcuchara del reactivo N-3K y luego ser agitada vigorosamente por un minuto. Finalmente se dejó en reposo la cubeta caliente durante 10 minutos y luego se midió la muestra en el fotómetro con una absorbancia de 575 nm para la lectura y los resultados se expresan en mg.L^{-1} (Figura 31).



Figura 31. Análisis de Nitrógeno. Fuente: Elaboración propia.

- **Medición de Fósforo**

El análisis de fósforo total se efectuó mediante la técnica de fotometría con el equipo WTW pHotoFlex® (Apéndice 31), mediante la metodología de (Merck, 2005, citado por Silva, 2014). (Xylem & Co. KG WTW, 2018), nos indica que el principio aplicado en esta metodología para determinación del fósforo se basa en el método vanadato-molibdato (fotometría Amarillo), en este proceso aparece el ortofosfato (PO_4^{-3}), mediante la adición de un reactivo de color compuesto por vanadato y molibdato. Luego bajo condiciones ácidas,

los iones del ortofosfato se añaden en los policaciones formados, producto a esto generan una intensidad amarilla dependiendo de la concentración del ortofosfato, y por último ser analizado fotométricamente.

Se tomó una muestra de 5 ml de cada tratamiento en un tubo de ensayo, luego se añadió cinco gotas del reactivo PO_4^{-1} para ser mezclado. Posteriormente se añadió una microcuchara del reactivo PO_4^{-2} , y por último se agitó vigorosamente hasta que el reactivo se haya disuelto completamente, finalmente se dejó en reposo cinco minutos para luego ser introducido en la cubeta para ser medido en el fotómetro con una absorbancia de 575 nm para la lectura y los resultados se expresan en mg.L^{-1} (Figura 32).



Figura 32. Análisis de Fósforo. Fuente: Elaboración propia.

- **Medición Potasio**

El análisis de potasio se efectuó mediante la técnica de fotometría con el equipo WTW pFotoFlex ® (Apéndice 32), mediante la metodología de (Merck, 2005, citado por Silva, 2014), (Gordillo, 2010) nos indica que el principio aplicado en esta metodología para la determinación de potasio se basa usando la adición de tetrafenilborato sódico (kalignost) un reactivo que produce una suspensión coloidal en donde se da que los iones de potasio se precipita como sal tetrafenilborato, la turbidez que se da de esa suspensión es proporcional a la concentración de potasio para poder ser analizado fotométricamente.

Se tomó una muestra de 2 ml en la cubeta con la muestra preparada para ser mezclada, luego se tomó en cuenta el valor de pH en donde debe encontrarse en el intervalo 10,0 – 11,5; seguidamente se añadió seis gotas del Reactivo K-1K y se mezcló, posteriormente se añadió una microcuchara del Reactivo K-2K y se disolvió mediante agitación, finalmente se dejó reposar cinco minutos y se procedió a medir en el fotómetro con una absorbancia de 575 nm para la lectura y los resultados se expresan en mg.L^{-1} (Figura 33).



Figura 33. Análisis de Potasio. Fuente: Elaboración propia.

2.7.3. Recuento de bacterias Oleofílicas.

Para el conteo de bacterias oleofílicas (ver Apéndice 28) se siguió la metodología de Samanaez (2008, p. 22), se procedió a tomar una muestra de 10 g de suelo de la unidad experimental de cada tratamiento y luego se homogenizó con 90 ml de solución salina. Luego se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-7} para ser distribuidas en tubos de 9 ml, posteriormente se depositó 1 ml de cada dilución en placas Petri estériles con medio Agar King B, fueron incubadas por 32°C por 24 a 48 horas y finalmente se realizó el conteo correspondiente (Figura 34).

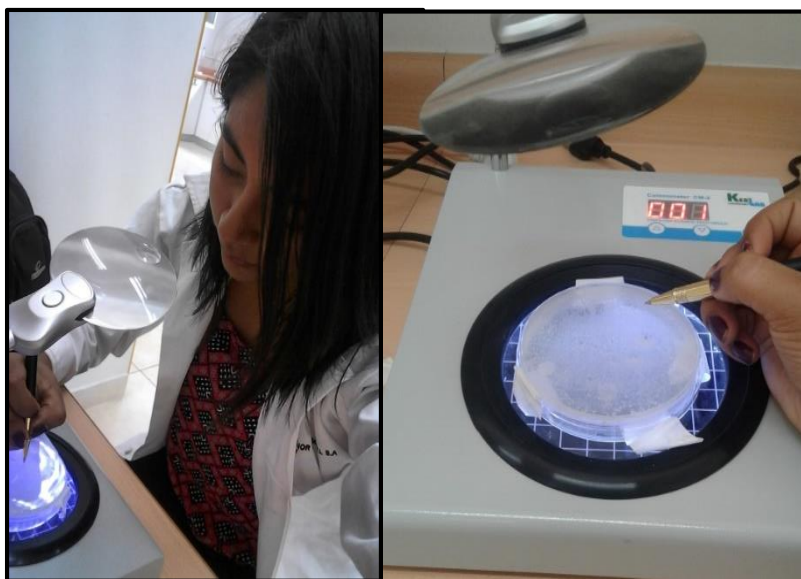


Figura 34. Conteo de colonias de cada una de las unidades experimentales.
Fuente: Elaboración propia.

2.7.4. Evaluación del porcentaje de reducción de crudo de petróleo al 3 % y 5 % en los tratamientos a los 30 y 60 días

Samanaez (2008) indica que para la extracción del crudo de petróleo a cada muestra se siguió la metodología 3540 EPA (ver Apéndice 29), utilizando el equipo Soxhlet con la cocinilla de 6 hornillos marca Reles modelo SL/D6 de la Universidad Católica Sedes Sapientiae de la filial de Huaura, Végueta (Figura 35).

Caldas (2012) indica que la extracción de Soxhlet es la técnica de separación sólido-líquido comúnmente usada para determinar grasas. Es un método estándar más utilizado actualmente como método oficial para la extracción continua de sólidos. Este equipo tiene la función de recircular vapores condensados con ayuda de un sifón a la fuente de disolvente que se encuentra en evaporación continua, arrastrando consigo la materia prima contenido en los cartuchos y la velocidad de recirculación depende directamente del tamaño y eficiencia del condensador. Es importante tener en cuenta la matriz (muestra sólida a analizar), el solvente y las condiciones de operación. Se empleó 250 ml del solvente (alcohol etílico) al 99 % a una temperatura constante de 60 °C por cada muestra de suelo de 10 g empaquetadas en sobres de papel filtro.

Para una adecuada extracción de petróleo presente en ese suelo se utilizó la siguiente fórmula para poder determinar el porcentaje de grasa:

$$G\% = \frac{m2 - m1}{M} \times 100$$

Donde:

m1: masa en g de la bombilla vacía (con trozo de porcelana y soporte).

m2: masa en g de la bombilla con grasa (con trozo de porcelana y soporte) tras el secado.

M: peso de la muestra en g.



Figura 35. Evaluación del porcentaje de remoción de crudo de petróleo de cada unidad experimental mediante metodología Soxhlet. *Fuente:* Elaboración propia.

2.8. Diseño estadístico del experimento

En la presente investigación para la biorremediación por bacterias del género *Pseudomonas fluorescens* de un suelo contaminado con crudo de petróleo, se utilizó un diseño completo al azar (DCA), y se sometieron a experimentación los siguientes tratamientos (Tabla 13).

Tabla 13

Tratamientos experimentales

Tratamiento	Composición
TC*	1 kg de SSE + 3 % de petróleo + 30 días
TC	1 kg de SSE + 3 % de petróleo + 60 días
TC	1 kg de SSE + 5 % de petróleo + 30 días
TC	1 kg de SSE + 5 % de petróleo + 60 días
T1	1 kg de SE + 100 ml de IPF de frijol + 3 % de petróleo + 30 días
T1	1 kg de SE + 100 ml de IPF de frijol + 3 % de petróleo + 60 días
T2	1 kg de SE + 100 ml de IPF de frijol + 5 % de petróleo + 30 días
T2	1 kg de SE + 100 ml de IPF de frijol + 5 % de petróleo + 60 días
T3	1 kg de SE + 100 ml de IPF de yuca+ 3 % de petróleo + 30 días
T3	1 kg de SE + 100 ml de IPF de yuca+ 3 % de petróleo + 60 días
T4	1 kg de SE + 100 ml de IPF de yuca+ 5 % de petróleo + 30 días
T4	1 kg de SE + 100 ml de IPF de yuca+ 5 % de petróleo + 60 días
T5	1 kg de SE + 100 ml de IPF de arracacha + 3 % de petróleo + 30 días
T5	1 kg de SE + 100 ml de IPF de arracacha + 3 % de petróleo + 60 días
T6	1 kg de SE + 100 ml de IPF de arracacha + 5 % de petróleo + 30 días
T6	1 kg de SE + 100 ml de IPF de arracacha + 5 % de petróleo + 60 días

IPF=Inóculo de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, SSE= Suelo sin esterilizar, SE= Suelo esterilizado.
Fuente: Elaboración propia.

2.9. Análisis estadístico de datos

En la presente investigación los datos obtenidos en cada unidad experimental fueron procesados en el programa Microsoft Excel para la elaboración de tablas y desviaciones estándar. Para el análisis se aplicó el programa estadístico software SPSS versión 24. Las diferencias significativas entre tratamientos TC*, TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6 fue mediante la aplicación de la prueba de Tukey. Luego se efectuó el análisis de varianza (ANOVA) entre los tratamientos, dosis, días y los parámetros: nitrógeno, fósforo, potasio, porcentaje de reducción de crudo de petróleo y conteo de colonias, con la finalidad de conocer que tratamiento obtuvo el mayor porcentaje de biorremediación del suelo contaminado con petróleo crudo. El análisis estadístico consideró un valor de significancia de ($p < 0,05$).

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1. Caracterización microbiológica y bioquímica de cepas nativas del género *Pseudomonas* a partir de la rizósfera de plantaciones de “frijol” (*Phaseolus vulgaris* L.), “yuca” (*Manihot esculenta* Crantz) y “arracacha” (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.)

a. Características morfológicas de las colonias correspondientes a *Pseudomonas fluorescens*

Las observaciones realizadas a las colonias obtenidas de los nódulos de las raíces de frijol, yuca y arracacha muestran que la pigmentación presentada en dicha población bacteriana es una fluorescencia verde. Lo cual coincide con las características visuales de la *Pseudomonas fluorescens* (Figura 36, 37 y 38).

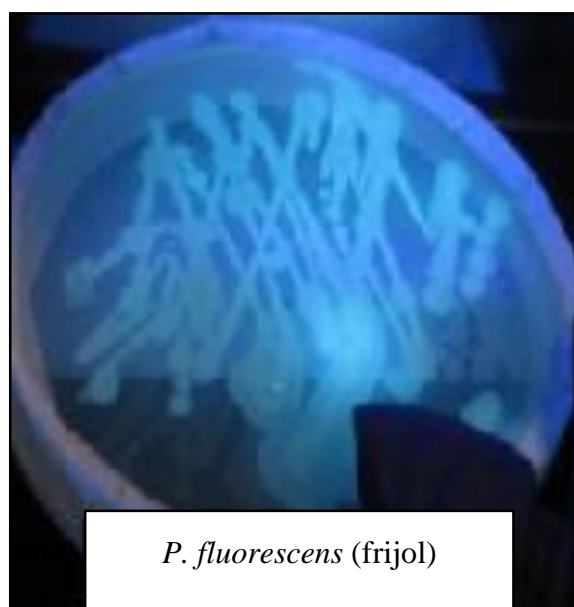


Figura 36. Bacteria *Pseudomonas fluorescens* aislada de las raíces de la planta del frijol. Fuente: Elaboración propia.

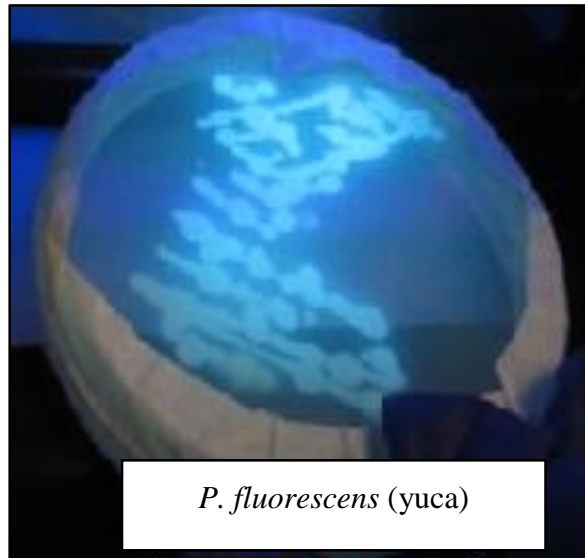


Figura 37. Bacteria *Pseudomonas fluorescens* aislada de las raíces de la planta de la yuca. *Fuente:* Elaboración propia.

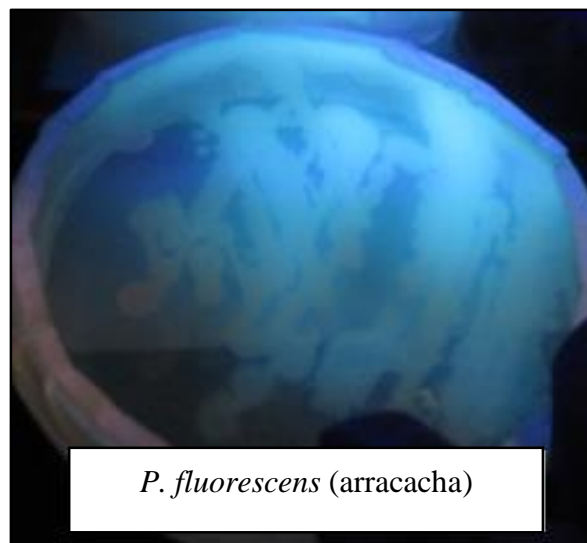


Figura 38. Bacteria *Pseudomonas fluorescens* aislada de las raíces de la planta de la arracacha. *Fuente:* Elaboración propia.

b. Caracterización morfológica de las células bacterianas de *Pseudomonas fluorescens*

Las células bacterianas de las cepas seleccionadas mediante tinción gran, corresponden a una morfología de bastón y se tiñen de color rojo indicando que pertenecen al grupo de las Gran negativas, tal como hace referencia para el género *Pseudomonas* (Figura 39, 40 y 41).

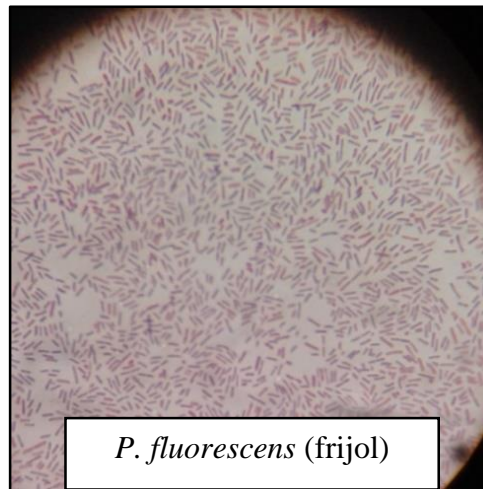


Figura 39. Pseudomonas fluorescens de la raíz de frijol (10X). Fuente: Elaboración propia.

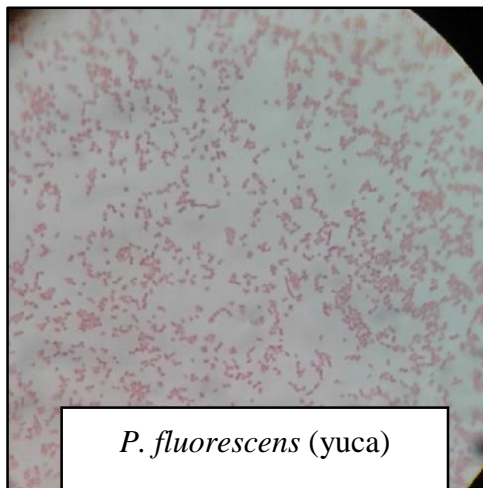


Figura 40. Pseudomonas fluorescens de la raíz de yuca (10X). Fuente: Elaboración propia.

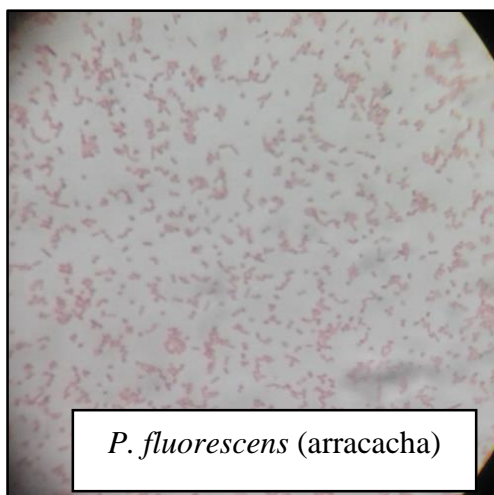


Figura 41. Pseudomonas fluorescens de la raíz de arracacha (10X). Fuente: Elaboración propia.

c. Caracterización bioquímica de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*.

- Métodos bioquímicos

Las pruebas bioquímicas caracterizan a las *Pseudomonas fluorescens* de manera positiva para Catalasa (+), Oxidasa (+), Citrato (+), Hidrólisis de gelatina (+), Ureasa (+) y Motilidad (+) según Samanaez (2008), tal como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14

Métodos bioquímicos para la identificación de la bacteria Pseudomonas fluorescens

Métodos bioquímicos	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
	Frijol	Yuca	Arracacha
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Citrato	+	+	+
Hidrólisis de gelatina	+	+	+
Ureasa	+	+	+
Motilidad	+	+	+

Fuente: Elaboración propia.

3.2. Evaluación de la capacidad emulsificante (Espectrofotometría UV-Vis) de las cepas seleccionadas con potencial degradador de hidrocarburos

En la Tabla 15 y figura 42 se muestra los resultados de absorbancia convertidos en actividad emulsificante (UAE/ml) para cada uno de los tratamientos evaluados.

Tabla 15

Actividad Emulsificante de las Pseudomonas fluorescens aisladas del frijol, yuca y arracacha

Cepas	Especie	Absorbancia	Actividad emulsificante (UAE/ml)
C1	Frijol	0,738	0,904
C2	Yuca	0,479	0,587
C3	Arracacha	0,635	0,778

Fuente: Elaboración propia.

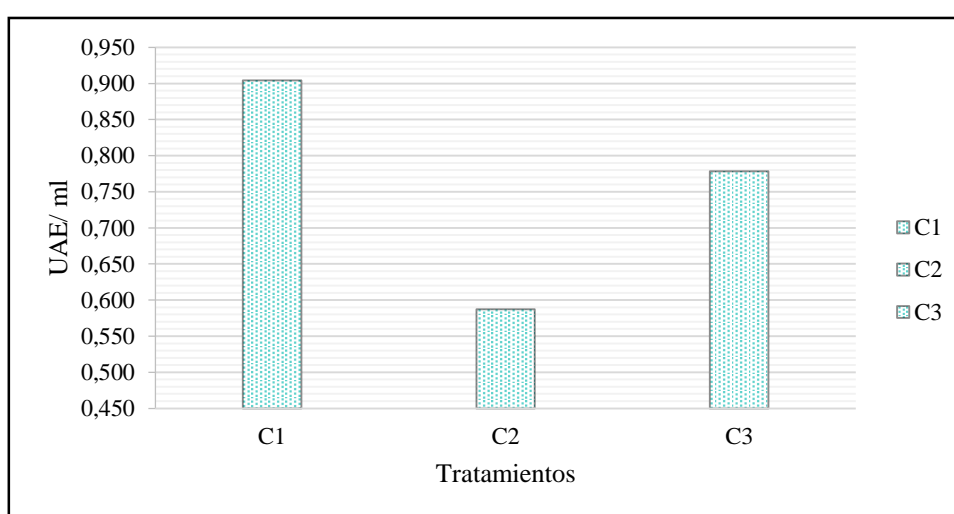


Figura 42. Actividad Emulsificante de la *Pseudomonas fluorescens* en cada uno de los tratamientos. Fuente: Elaboración propia.

3.3. Resultados de la evaluación de las variables implicadas en el proceso de biorremediación del crudo de petróleo

- a. Resultados del porcentaje de reducción de crudo de petróleo al 3 % y 5 % v/v en los tratamientos a los 30 y 60 días.

Los resultados del Análisis de Varianza de los valores del porcentaje de reducción de crudo de petróleo (Apéndice 1) muestran que hubo un efecto significativo ($p < 0,05$) en: la dosis de crudo de petróleo, días de exposición al contaminante, en los tratamientos, en la interacción dosis*tratamiento, días*tratamiento y dosis*días*tratamiento, significando que cada uno de estos factores influyeron positivamente en el efecto del porcentaje de reducción del crudo de petróleo. No se encontraron efectos estadísticamente significativos ($p > 0,05$), en la

interacción dosis*días ($p=0,369$), lo que evidencia que los factores experimentales actuaron de forma dependiente (ver Apéndice 7).

La prueba de Tukey mostró que la comparación de medias de los valores del porcentaje de reducción de crudo de petróleo de los TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6 presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) a los 30 y 60 días (ver Apéndice 8). Las medias y desviaciones estándar de los valores del porcentaje de reducción de crudo de petróleo para todos los tratamientos mostraron un aumento de reducción de crudo de petróleo presente en el suelo a los 30 y 60 días (ver Apéndice 9).

En la Tabla 16 muestra los valores de porcentaje de reducción de crudo de petróleo al 3 % y 5 % en un periodo de 30 y 60 días; en el que para una dosis del 3 % a los 30 días, el tratamiento más eficaz fue el T3= 44,10 % y a los 60 días fue el TC*= 76,27 % y el T1= 74,70 %, mientras que a una dosis del 5 %, el T4 fue el más eficiente siendo a 30 días, T4=75,26 % y a los 60 días, T4= 85,50 % de reducción de crudo de petróleo presente en el suelo.

Tabla 16

Valores de porcentaje de reducción de crudo de petróleo en los tratamientos (TC, TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6) a dosis de crudo de petróleo (3 % y 5 %) evaluados a los 30 y 60 días*

Tratamientos	Periodo	
	30 días	60 días
TC	18,47 %	76,27 %
TC*	41,06 %	84,86 %
T1	39,50 %	74,70 %
T2	66,52 %	78,22 %
T3	44,10 %	67,57 %
T4	75,26 %	85,50 %
T5	19,10 %	47,67 %
T6	36,22 %	66,28 %

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 43 se observa el comportamiento de la interacción del porcentaje de reducción de crudo de petróleo a los diferentes tratamientos por lo que se evidencia que tuvieron una reducción a los 30 y 60 días, destacándose que para una dosis del 3% a los 30 días, el TC* y el T1 una reducción de un suelo contaminado con crudo de petróleo, mientras que para una dosis del 5 % fue el 5% y el T4 para una reducción de un suelo contaminado con crudo de petróleo al 3% y 5 % a los 30 y 60 días.

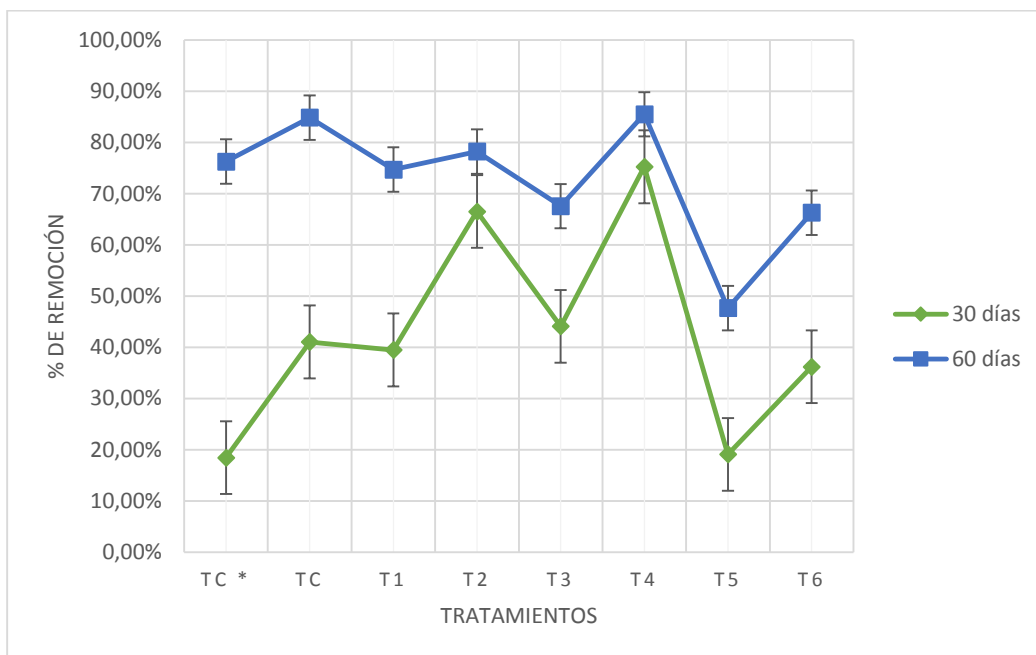


Figura 43. Promedio de valores del porcentaje de reducción de un suelo contaminado con crudo de petróleo al 3 % y 5 %, según los días y tratamientos.
Fuente: Elaboración propia.

b. Resultados de análisis de pH

Los resultados del Análisis de Varianza de los valores de pH (ver Apéndice 2) muestran que hubo un efecto estadísticamente significativo en los tratamientos ($p=0,0245$) y en la interacción dosis de crudo de petróleo*días de exposición al contaminante ($p=0,008$). Esto refleja que cada uno de estos factores influyeron positivamente en el efecto del pH. No se observaron efectos estadísticamente significativos de interacción ($p>0,05$) en las formas independientes a dosis, días, tratamiento y en la interacción entre dosis*tratamiento, días*tratamiento y dosis*días*tratamiento (ver Apéndice 10). La prueba de Tukey mostró que la comparación de medias de valores de pH de los TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6 no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) a los 30 y 60 días (ver Apéndice 11).

En la Tabla 17, se muestran las medias y desviaciones estándar de los valores de pH, las dosis de crudo de petróleo y días. Se presenta que los valores de pH en el suelo contaminado con 3 % de crudo de petróleo tuvo una disminución con un valor promedio inicial para: TC*= 8,325±0,126 mg/L, T1= 8,16±0,082mg/L, T3= 8,146±0,061mg/L y T5= 8,164±0,074mg/L y con un promedio final del TC*= 8,075±0,299 mg/L, T1= 8,069±0,095mg/L, T3= 8,126±0,035mg/L y T5= 8,125±0,140 mg/L. Para una dosis del 5 % de crudo de petróleo en el suelo, se tuvo un aumento de pH a los 60 días, con un valor promedio inicial del TC= 8,206±0,312 mg/L, T4= 8,058±0,234 mg/L, T6= 8,16±0,094 mg/L y con un promedio final del TC= 8,44±0,060 mg/L, T4= 8,317±0,053 mg/L, T6= 8,223±0,087 mg/L. El T2 hubo una disminución de pH a los 60 días con un promedio inicial de T2= 8,168±0,100 mg/L y con un promedio final de T2= 8,06±0,106 m g/L.

Tabla 17

Valores promedios y desviación estándar (± DS) del pH en los tratamientos (TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6) a dosis de crudo de petróleo (3 % y 5 %) evaluados durante 30 y 60 días

Tratamientos	Periodo	
	30 días	60 días
TC	8,325±0,126	8,075±0,299
TC*	8,206±0,312	8,44±0,060
T1	8,16±0,082	8,069±0,095
T2	8,168±0,100	8,06±0,106
T3	8,146±0,061	8,126±0,035
T4	8,058±0,234	8,317±0,053
T5	8,164±0,074	8,125±0,140
T6	8,16±0,094	8,223±0,087

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 44 se observa el comportamiento de la interacción del pH en los tratamientos, a una dosis de crudo de petróleo al 3 %, el cual se evidencia que el TC*, T1, T3 y T5 tuvieron un comportamiento antagónico disminuyendo el pH a los 60 días. Y con respecto a una dosis de crudo de petróleo al 5 %, se evidencia que el TC, T4 y T6 aumentó mientras que el T2 disminuyó a los 60 días.

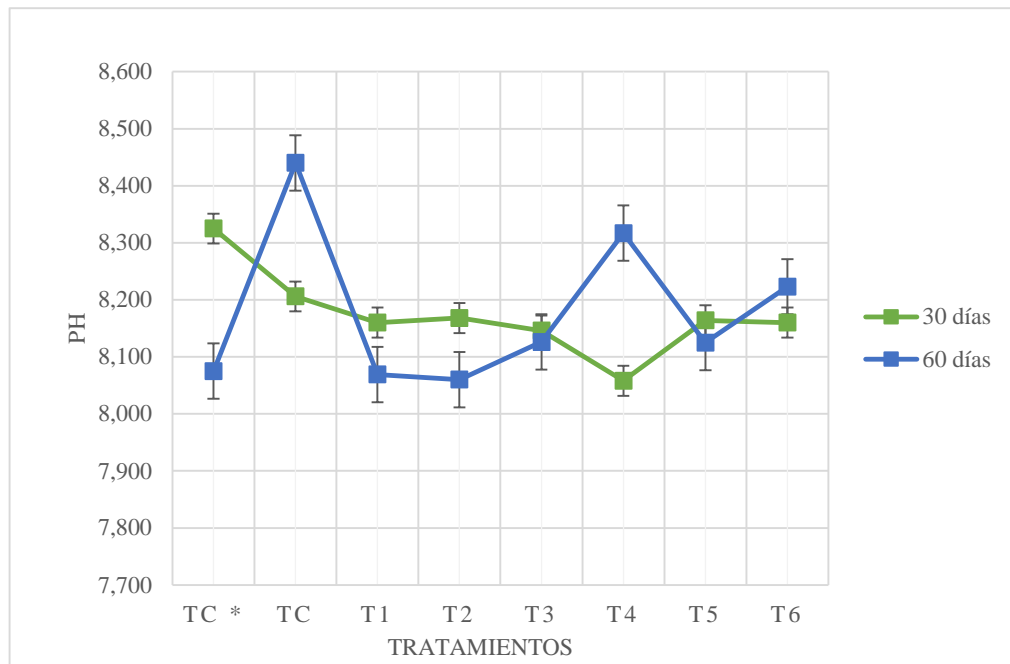


Figura 44. Promedio de valores de pH, en suelo contaminado con crudo de petróleo al 3 % y 5 %, según días y tratamientos. Fuente: Elaboración propia.

c. Resultados de análisis de nitrógeno total

Los resultados del Análisis de Varianza de los valores de nitrógeno total (ver Apéndice 3) muestran que hubo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en: la dosis de crudo de petróleo, días de exposición al contaminante, tratamientos, en la interacción; dosis*días, días*tratamiento y dosis*días*tratamientos, demostrando que cada uno de estos factores influyeron positivamente en el efecto del nitrógeno. No se observaron efectos significativos de interacción ($p > 0,05$) en las formas independientes a dosis, días, tratamiento y en la interacción entre dosis*tratamiento, días*tratamiento y dosis*días*tratamiento (ver Apéndice 12). La prueba de Tukey mostró que el T1 y T5 presentaron una alta variación a diferencia de los demás tratamientos (ver Apéndice 13).

En la Tabla 18, se muestran las medias y desviaciones estándar de los valores de nitrógeno, la dosis de crudo de petróleo y días. Se presenta que los valores de nitrógeno en el suelo contaminado con 3 % de crudo de petróleo tuvo un aumento de concentración de nitrógeno para los 60 días, con un valor promedio inicial en el TC* = $13,53 \pm 0,021$ mg/L y T5 = $7,477 \pm 0,020$ mg/L y con un promedio final del TC* = $14,29 \pm 0,267$ mg/L y T5 = $9,872 \pm 0,012$

mg/L, mientras que el T1 y T3 disminuyeron a los 60 días, con un valor promedio inicial de T1= 8,855±0,038 mg/L y T3= 12,532±0,038 mg/L y con un promedio final del T1= 6,25±0,021 mg/L y T3= 10,792±0,080 mg/L.

Y con respecto a una dosis 5 % de crudo de petróleo en el suelo tuvo una disminución a los 60 días, con un valor promedio inicial de TC= 12,732±0,025 mg/L, T2= 14,575±0,012 mg/L, T4= 14,742±0,022 mg/L y T6= 13,062±0,017 mg/L respectivamente y con un promedio final del TC= 12,015±0,013 mg/L, T2= 13,653±0,018 mg/L, T4= 13,927±0,018 mg/L y T6= 12,092±0,017 mg/L.

Tabla 18

Valores promedios y desviación estándar (± DS) del nitrógeno en los tratamientos (TC, TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6) a dosis de crudo de petróleo (3 % y 5 %) evaluados durante los 30 y 60 días*

Tratamientos	Periodo	
	30 días	60 días
TC *	13,53±0,021	14,29±0,267
TC	12,732±0,025	12,015±0,013
T1	8,855±0,038	6,25±0,021
T2	14,575±0,012	13,653±0,018
T3	12,532±0,038	10,792±0,080
T4	14,742±0,022	13,927±0,018
T5	7,477±0,020	9,872±0,012
T6	13,062±0,017	12,092±0,017

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 45 se observa el comportamiento de la interacción del nitrógeno en los tratamientos, a una dosis de crudo de petróleo al 3 %, evidenciándose que los tratamientos TC* y T5 muestran un decrecimiento y el T1 y T3 muestran un aumento en el nivel de nitrógeno a los 60 días. Mientras que para una dosis de crudo de petróleo al 5 % se evidencia que el TC, T2, T4 y T6 disminuyeron el nivel de nitrógeno a los 60 días.

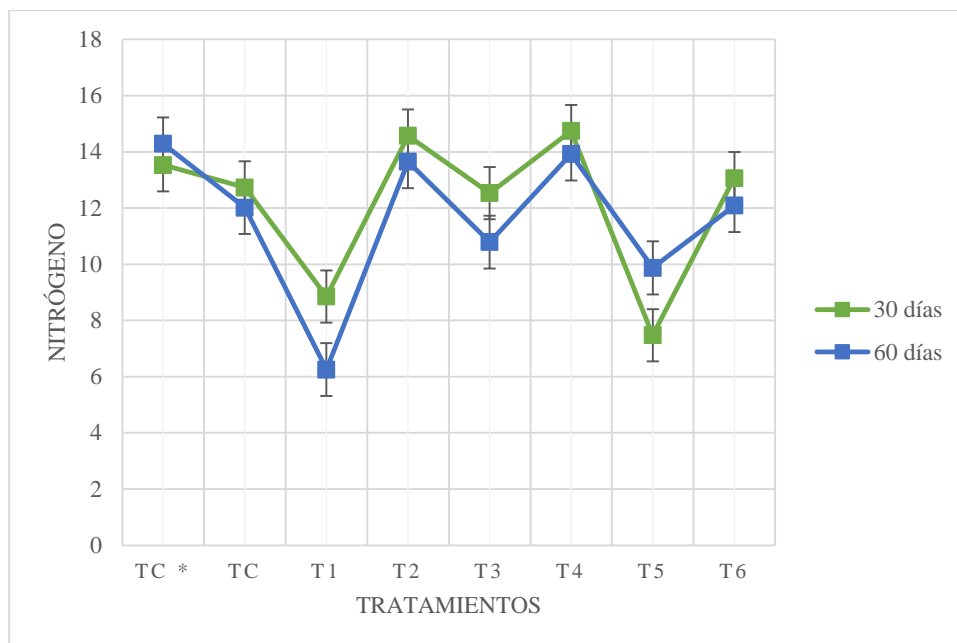


Figura 45. Promedio de valores de nitrógeno, en un suelo contaminado con crudo de petróleo al 3 % y 5 % según días y tratamientos. Fuente: Elaboración propia.

d. Resultados de análisis de fósforo

Los resultados del Análisis de Varianza de los valores de fósforo (ver Apéndice 4) muestran que hubo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en: los días de exposición al contaminante, los tratamientos, en la interacción dosis del crudo de petróleo*tratamientos, días*tratamientos y dosis*días*tratamientos, significando que cada uno de estos factores influyeron positivamente en el efecto del fósforo. No se observaron efectos estadísticamente significativos de interacción ($p > 0,05$), en la dosis ($p = 0,060$) y en la interacción dosis*días ($p = 0,513$), lo que evidencia que los factores experimentales actuaron de forma dependiente (ver Apéndice 14). La prueba de Tukey mostró que el TC* y el T6 mostraron una alta variación a diferencias de los demás tratamientos (ver Apéndice 15).

En la Tabla 19, se muestran las medias y desviaciones estándar de los valores de fósforo, la dosis de crudo de petróleo y días. Se presenta que los valores de fósforo en el suelo contaminado con 3 % de crudo de petróleo para el TC* y T5, disminuyó a los 60 días, con un valor promedio inicial del TC* = $0,233 \pm 0,012$ mg/L, T5 = $0,162 \pm 0,020$ mg/L y con un promedio final de TC* = $0,138 \pm 0,013$ mg/L, T5 = $0,155 \pm 0,010$ mg/L, mientras que el T1 y T3 presentaron un aumento a los 60 días con un valor promedio inicial de T1 = $0,101 \pm 0,017$

mg/L, T3= 0,095±0,016 mg/L y con un promedio final de T1= 0,145±0,004 mg/L y T3= 0,106±0,010 mg/L.

Y con respecto a una dosis del 5 % de crudo de petróleo en el suelo tuvo un aumento de concentración de fósforo, con un valor promedio inicial de TC= 0,1±0,018 mg/L, T4= 0,107±0,017 mg/L y con un promedio final de TC= 0,175±0,004 mg/L, T4= 0,17±0,010 mg/L. El T2 y T6 presentaron una disminución a los 60 días con un valor promedio inicial de T2= 0,175±0,004 mg/L, T6= 0,245±0,004 mg/L y con un promedio final de T2= 0,112±0,012 mg/L, T6= 0,105±0,023 mg/L.

Tabla 19

Valores promedios y desviación estándar (± DS) del fósforo en los tratamientos (TC, TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6) a dosis de crudo de petróleo (3 % y 5 %) evaluados a los 30 y 60 días*

Tratamientos	Periodo	
	30 días	60 días
TC*	0,233±0,012	0,138±0,013
TC	0,1±0,018	0,175±0,004
T1	0,101±0,017	0,145±0,004
T2	0,175±0,004	0,112±0,012
T3	0,095±0,016	0,106±0,010
T4	0,107±0,017	0,17±0,010
T5	0,162±0,020	0,155±0,010
T6	0,245±0,004	0,105±0,023

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 46 se observa el comportamiento de la interacción del fósforo en los tratamientos a una dosis de crudo de petróleo al 3 %, donde se evidencia que el TC* y T5 tuvieron un comportamiento antagónico a nivel del fósforo con una disminución, y un aumento en el T1, T3 a los 60 días. Y con respecto a una dosis de crudo de petróleo al 5 %, muestra que hubo una disminución en el T2 y T6 mientras que el TC y T4 aumentaron a los 60 días.

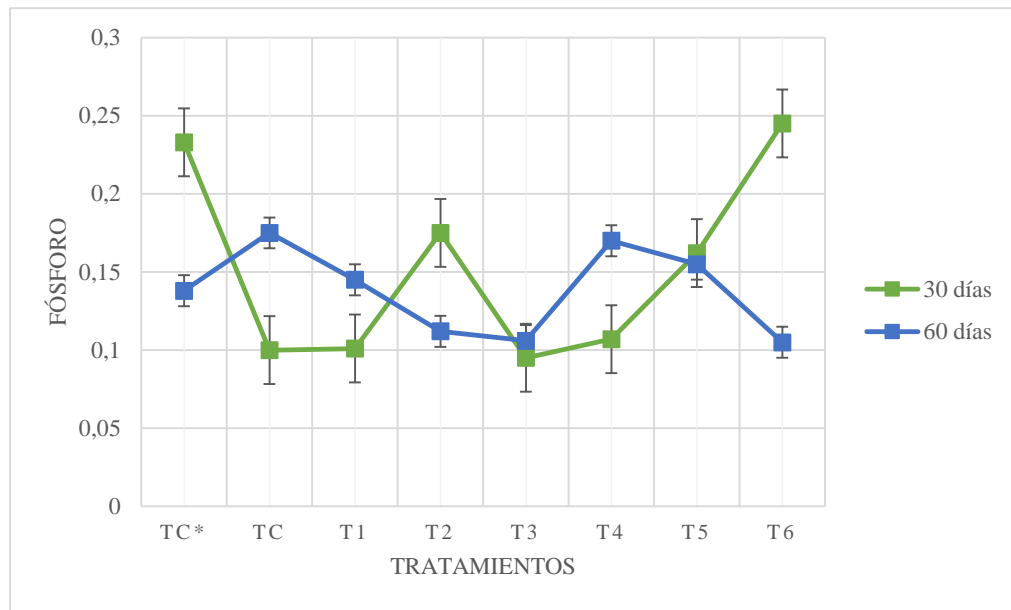


Figura 46. Promedio de valores de fósforo en un suelo contaminado con crudo de petróleo al 3 % y 5 % según días y tratamientos. Fuente: Elaboración propia.

e. Resultados de análisis de potasio

Los resultados del Análisis de Varianza de los valores de potasio (ver Apéndice 5) muestran que hubo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en: la dosis del crudo de petróleo, días de exposición del contaminante, tratamientos, en la interacción dosis*tratamiento, dosis*días, días*tratamiento y dosis*días*tratamiento significando que cada uno de estos factores influyeron positivamente en el efecto del potasio. (Apéndice 16). La prueba de Tukey mostró que la comparación de medias de los valores de potasio de los TC, TC* y T5 presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) a los 30 y 60 días (ver Apéndice 17).

En la Tabla 20, se muestran las medias y desviaciones estándar de los valores de potasio, la dosis de crudo de petróleo y días. Se presenta que los valores de potasio en el suelo contaminado con 3 % de crudo de petróleo disminuyó a los 60 días, con un valor promedio inicial de TC* = $82,285 \pm 0,258$ mg/L, con un promedio final de TC* = $54,037 \pm 0,143$ mg/L. El T1, T3 y T5, los valores de potasio aumentaron con un valor promedio inicial de T1 = $57,93 \pm 0,069$ mg/L, T3 = $53,845 \pm 0,170$ mg/L y T5 = $79,072 \pm 0,303$ mg/L y con un promedio final de T1 = $59,055 \pm 0,138$ mg/L, T3 = $56,6 \pm 0,132$ mg/L y T5 = $86,827 \pm 0,210$ mg/L.

Y con respecto a una dosis del 5 % de crudo de petróleo en el suelo tuvo una disminución del nivel de potasio a los 60 días, con un valor promedio inicial de TC= 53,282±0,173 mg/L, T2= 51,092±0,129 mg/L, T4= 51,59±0,077 mg/L y T6= 59,225±0,172 mg/L con un promedio final de TC= 20,455±0,094 mg/L, T2= 50,557±0,046 mg/L, T4= 50,825±0,081 mg/L y T6= 57,295 ±0,012 mg/L.

Tabla 20

Valores promedios y desviación estándar (\pm DS) del potasio en los tratamientos (control, T1, T2 y T3) a dosis de crudo de petróleo (3 % y 5 %) evaluados a los 30 y 60 días

Tratamientos	Periodo	
	30 días	60 días
TC*	82,285±0,258	54,037±0,143
TC	53,282±0,173	20,455±0,094
T1	57,93±0,069	59,055±0,138
T2	51,092±0,129	50,557±0,046
T3	53,845±0,170	56,6±0,132
T4	51,59±0,077	50,825±0,081
T5	79,072±0,303	86,827±0,210
T6	59,225±0,172	57,295±0,012

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 47 se observa el comportamiento de la interacción del potasio en los tratamientos a una dosis de crudo de petróleo al 3 %, en el que el tratamiento TC* tuvo un comportamiento antagónico a nivel del potasio, puesto a que muestra una disminución, mientras que el T1, T3 y T5 muestran un aumento a los 60 días. Y con respecto a una dosis de crudo de petróleo al 5 % se observa que TC, T2, T4 y T6 tuvieron una disminución a los 60 días.

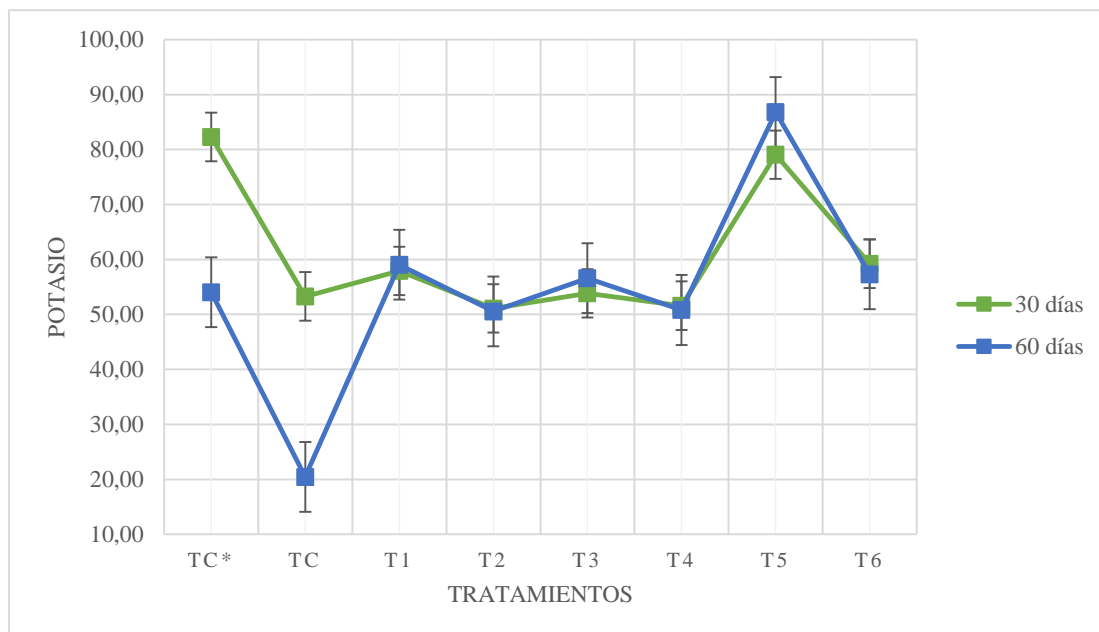


Figura 47. Promedio de valores de potasio, en un suelo contaminado con crudo de petróleo al 3 % y 5 % según días y tratamientos. *Fuente:* Elaboración propia.

f. Resultados de conteo de colonias

Los resultados del Análisis de Varianza de los valores del conteo de colonias (ver Apéndice 6) muestran que hubo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$), en: la dosis del crudo de petróleo, días de exposición, tratamientos, en la interacción dosis*tratamiento, dosis*días, días*tratamiento y dosis*días*tratamiento significando que cada uno de estos factores influyeron positivamente en el efecto del conteo de colonias (Apéndice 18). La prueba de Tukey mostró que la comparación de medias de los valores del conteo de colonias de los tratamientos T1, T3 y T6 presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) a los 60 días (ver Apéndice 19).

En la Tabla 21, se muestran las medias y desviaciones estándar de los valores del conteo de colonias, la dosis de crudo de petróleo y días. Se presenta que los valores del conteo de colonias en el suelo contaminado con 3 % de crudo de petróleo, para el TC* y T3 disminuyó a los 60 días, con un valor promedio inicial para el TC*= $130625000 \pm 11086778,9$ (Bact/ml) y T3= $23775000 \pm 95742,71$ (Bact/ml) y con un promedio final del TC*= $2547500 \pm 17078,25$ (Bact/ml) y T3= $280000 \pm 816,496$ (Bact/ml). El T1 y T5, aumentaron con un valor promedio

inicial de T1= 263500±577,35 (Bact/ml), T5= 285500±1290,99445 (Bact/ml), y con un promedio final de T1= 274000000±8164965,81 (Bact/ml) y T5= 2700000±8164,965 (Bact/ml).

Y con respecto a una dosis del 5 % de crudo de petróleo en el suelo tuvo una disminución a los 60 días, en el T4, con un promedio inicial de T4= 2905000±12909,944 (Bact/ml) y con un promedio final de T4= 279250±957,427 (Bact/ml), mientras que los TC, T2 y T6 aumentaron a los 60 días con un promedio inicial en el TC= 1590,25±1,258 (Bact/ml), T2= 250225±518,812 (Bact/ml) y T6= 2599750±8578,072 (Bact/ml) con un promedio final de TC= 146750±1258,305 (Bact/ml), T2= 2975000±5773,502 (Bact/ml) y T6= 256000000±816496,58 (Bact/ml).

Tabla 21

Valores promedios y desviación estándar (± DS) del conteo de colonias en los tratamientos (TC, T1, T2, T3, T4, T5 y T6) a dosis de crudo de petróleo (3 % y 5 %) evaluados a los 30 y 60 días

Tratamientos	Periodo	
	30 días	60 días
TC*	130625000±11086778,9	2547500±17078,25
TC	1590,25±1,258	146750±1258,305
T1	263500±577,35	274000000±8164965,81
T2	250225±518,812	2975000±5773,502
T3	23775000±95742,71	280000±816,496
T4	2905000±12909,944	279250±957,427
T5	285500±1290,99445	2700000±8164,965
T6	2599750±8578,072	256000000±816496,58

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 48 se observa el comportamiento de la interacción del conteo de colonias en los tratamientos a una dosis de crudo de petróleo al 3 %, donde se evidencia que el TC* y T3 mostraron una disminución, mientras que el T1 y T5 aumentó a los 60 días. Y con respecto a una dosis de crudo de petróleo al 5 % se evidencia que el T4 disminuyó, mientras que el TC, T2 y T6 aumentaron a los 60 días.

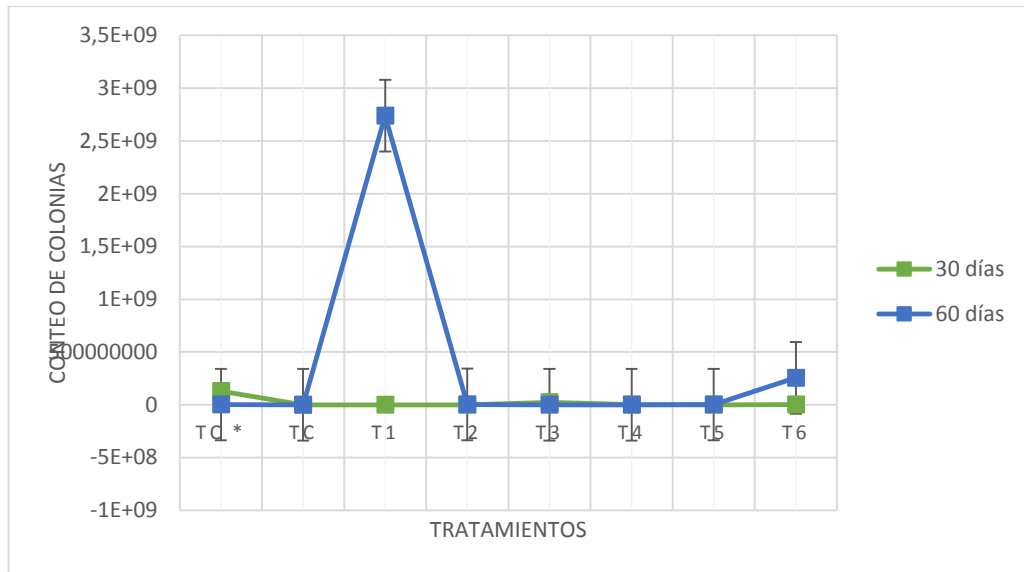


Figura 48. Promedio de valores del conteo de colonias en un suelo contaminado con crudo de petróleo al 3 % y 5 %, según días y tratamientos.
Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO IV: DISCUSIONES

Este trabajo es el primer estudio en el Perú en evaluar el potencial degradador de crudo de petróleo por parte de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, aisladas de raíces de plantas de cultivos orgánicos de “frijol” (*Phaseolus vulgaris* L.), “yuca” (*Manihot esculenta* Crantz) y “arracacha” (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.). Los resultados de emisión de fluorescencia de la cepa aislada en este estudio es similar a los que obtuvieron Ulloa *et al.* (2011) quienes aislaron esta bacteria a partir del cultivo de la papa, y al ser expuestas las colonias a luz UV se observó una coloración verde. Esto se debió a la producción de un pigmento verde-amarillo denominado fluoresceína. Del mismo modo Guerra *et al.* (2011) aislaron a partir de cultivos de arveja donde presentaron características fluorescentes al ser sometidas a luz UV. De igual forma Uribe *et al.* (1999) aislaron esta bacteria a partir de raíces de papa en medio King B presentando variaciones de color azul claro, verde amarillento intenso y con el tiempo un pigmento café.

Respecto a las pruebas bioquímicas sometidas a la bacteria; un estudio similar de Echevarría (2012) obtuvieron un resultado positivo para pruebas de TSI, oxidasa, catalasa, licuefacción de la gelatina, al igual que esté presente estudio. De igual forma en el estudio de Schoebitz (2006) aislaron *Pseudomonas* a partir de la rizósfera *Lolium perenne* L., las bacterias fueron sembradas en medio Agar Centrimide y se identificaron mediante el sistema API 20 NE las pruebas bioquímicas (ureasa, oxidasa, test O/F, citrato y TSI), permitiendo poner en evidencia la diversidad entre una cepa y las otras (*Azospirillum* sp., *Herbaspirillum* spp., *Pseudomonas* sp. y de la familia *Enterobacteriaceae*). La actividad emulsificante de la *Pseudomonas fluorescens* fluctuó entre 0,587 y 0,904 UAE/ml, destacándose el C1 de la cepa extraída del nódulo de frijol siendo mayor en este estudio al reportado por Escalante (2002), que evidenció que de las 128 cepas bacterianas aisladas mostraron una actividad emulsificante solo el 99,22 % y 0,77 % no la presentó, y fluctuó entre 0,75 UAE/ml y 3,66 UAE/ml siendo las cepas con mayor actividad emulsificante:

Pseudomonas aeruginosa 4k-1, *Serratia rubidae* 6B9 y *Bacillus sp.* 6Bh, presentados dentro del rango de actividad emulsificante de este estudio.

Del mismo modo el estudio de Quiliche *et al.* (2016) aislaron cinco *Pseudomonas aeruginosa* de suelos de talleres de automóviles presentando una actividad emulsificante entre 2,75 (UAE/ml) y 1,02 (UAE/ml) siendo efectivos para el campo de la biorremediación. Sin embargo, Giraldo (2012) evidenciaron que la *Pseudomonas fluorescens* no presentó una actividad emulsificante y la *Pseudomonas aeruginosa* sí; siendo la mayor entre todas la *Pseudomonas aeruginosa* PB 25 con un 0,5343 (UAE/ml). Esta propiedad emulsificante se ve influenciado fuertemente por el sustrato que es el crudo de petróleo, temperatura y el pH que son condiciones adecuadas para el crecimiento y metabolismo de la bacteria, permitiendo así la solubilidad y transporte del crudo de petróleo a nivel de su membrana. De igual forma Toribio- Jiménez *et al.* (2014) indica que esta propiedad del compuesto microbiano se debe a que el género *Pseudomonas* comúnmente producen biosurfactantes de naturaleza glicolípídica llamados ramnolípidos, estos a su vez tienen la capacidad de emulsificar hidrocarburos y estabilizar emulsiones.

La presente investigación ha demostrado que el comportamiento del porcentaje de biorremediación del crudo de petróleo en cada uno de los tratamientos al 3 % en un periodo de 30 días el más eficaz fue el T3 con un 44,10 % y en un periodo de 60 días fue el T1 con 74,70 % de reducción de crudo de petróleo. Y con respecto a una dosis de 5 % en un periodo de 30 días el más eficaz fue el T4 con 75,26 % y en un periodo de 60 días fue el T4 con 85,50 %; indicando así que las bacterias *Pseudomonas fluorescens* aisladas de las raíces de frijol, yuca y arracacha biorremedian un suelo contaminado con crudo de petróleo, puesto a que estas bacterias pertenecen a uno de los géneros degradadores de HAPs: esto es debido por los enlaces de carbonos que presenta el crudo de petróleo y la capacidad biosurfactante que tiene la bacteria para tomar el carbono del crudo de petróleo como su fuente de carbono, solubilizándolo y transportándolo a su membrana, logrando así la biorremediación, de manera eficiente a un pH, temperatura, humedad y nutrientes adecuados que bioestimulan la capacidad degradativa.

Estudios similares Bocángel (2016) evidenció que la utilización de tres terrarios conformados por: control abiótico, consorcio control y consorcio Psicotolerante (*Pseudomona putida*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomona aeruginosa*, *Aeromonas sp.*, *Stenotrophomonas rhizophila* y *Paenibacillus lautus*), con un inóculo bacteriano de 130 ml, un suelo de 1,3 kg y se adicionó una dosis de crudo de petróleo de 5 % (p/p), para una evaluación a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días; mostrando como resultado a los 30 días el terrario Psicotolerante de un 58,41 % de porcentaje de reducción. Asimismo, el estudio de Muñoz (2016) evaluó la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, se aplicó 110 ml de hidrocarburo en 2,5 kg de suelo y con inóculo bacteriano de 100 ml, estableciendo los siguientes tratamientos: T0= suelo + hidrocarburo, T1= suelo + hidrocarburo + *Trichoderma*, T2= suelo + hidrocarburo + *P. fluorescens* y T3= suelo + hidrocarburo + *Trichoderma* + *P. fluorescens* para un evaluación de un periodo de 90 días obteniendo como resultado el T0= 42,6 %, T1= 98,3 %, T2= 99,0 % Y T3= 99,1 %, siendo mayor eficiente el tratamiento con inóculo de *P. fluorescens*.

Similar estudio de Pérez (2018) evidenció que la utilización de la *Pseudomonas fluorescens* en la degradación de HAPs muestra que los valores iniciales de HAPs para: 8,2 mg/kg de Acenaftaleno, 7,3 mg/kg de Benzo (a) antraceno, 32 mg/kg de Fenantreno y 65 mg/kg de Naftaleno redujeron a 0,1 mg/kg en cada uno de los hidrocarburos mencionados, lo cual indica un 99,25 % de HAPs degradados, esto se debió a condiciones ambientales ideales de la bacteria (pH, temperatura, conductividad eléctrica y humedad) y al proceso de generación de metabolitos permitieron la fragmentación de anillos aromáticos de los HAPs, transformándolos así a productos más sencillos y menos tóxicos. A su vez, Samanaez (2008) seleccionó un consorcio bacteriano conformado por: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus sp.* para el proceso de degradación de un suelo contaminado con 1,5 L de crudo de petróleo, el autor demostró que la reducción total de hidrocarburos fue mayor en el terrario bioaumentado con fertilizante inorgánico (B+F), con 71,4 % de degradación en 30 días, esto se debe a la bioestimulación de las bacterias con fertilizantes inorgánicos para el proceso de degradación. Seguido del terrario nativo con fertilizante inorgánico (N+F) con un 66,7 %, luego el terrario bioaumentado sin fertilizante inorgánico (B-F) con un 61,9 %, posteriormente el terrario nativo sin fertilizante inorgánico (N-F) con un 52,3 % y finalmente el control abiótico (CA) con un 28 %.

De igual forma el estudio de Kumar *et al.*, (2014) mostró que la eficiencia de la biodegradación del aceite diesel por *P. fluorescens* aumentó en la eficiencia en los primeros dos o tres días de incubación evidenciando una rápida degradación con un promedio del 54 % de eficacia de biodegradación y que después al quinto día disminuyó el porcentaje de eficacia a menos del 40 %, el autor indica que las actividades de las enzimas de *Pseudomonas* (deshidrogenasa, catalasa, ureasa y polifenol oxidasa) forman parte importante en el proceso de degradación. Por su parte Escalante (2002) evaluó la biodegradación de crudo en suelos de cultivo utilizando el control abiótico, el consorcio nativo y el consorcio exógeno conformado por: *Serratia rubidae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus sp.*, el mayor porcentaje de biodegradación fue obtenido en el terrario que contenía el consorcio bacteriano exógeno con el 92,5 % a los noventa días con una reducción de 1,2 g de hidrocarburos/25 g de suelo a 0,09 g de hidrocarburos/25 g de suelo a comparación con el consorcio bacteriano nativo con el 60 % y 55 % del control abiótico.

En la presente investigación el pH se mostró constante en las unidades experimentales en niveles entre 8 y 8,5; y presentó una ligera variación entre tratamientos a diferentes concentraciones del 3 % y 5 % de crudo de petróleo a los 30 y 60 días del periodo de evaluación, esto se debe posiblemente a que la *Pseudomonas fluorescens* modifica el pH del medio por su capacidad degradativa y acción de su metabolismo para su crecimiento y biodisponibilidad del sustrato (crudo de petróleo) y de los nutrientes que bioestimulan a la bacteria para lograr así el proceso de biorremediación. Bastidas y Cedeño (2016) mostraron que durante su proceso de degradación de TPH, el nivel de pH fluctuó entre 5,9 y 7,5 al evaluar la eficiencia entre la *Pseudomonas aeruginosa* y la *Pseudomonas putida*. Del mismo modo Pérez (2018) evaluó la biodegradación de la *Pseudomonas fluorescens* a 8,2 mg/kg de Acenaftaleno, 7,3 mg/kg de Benzo antraceno, 3,2 mg/kg de Fenantreno y 6,5 mg/kg de naftaleno, en el cual el pH presentó un rango entre 7,7 a 8,0 logrando así más del 90 % de degradación.

Estudio similar por Pérez *et al.*, (2015) muestran que en el suelo antes de ser contaminado obtuvo un pH de 5, y en el proceso de degradación entre la combinación de gasolina-etanol y diesel-biodiesel mostró valores de pH entre 8,5 a 9,0 que se estabilizó en el transcurso del proceso de biorremediación. Este aumento se debió a que hubo formación de carbonatos de

sodio y otros carbonatos posibles, lo cual provocó que el suelo se alcalinizara. Y por último Arrieta *et al.*, (2012) indican que para el proceso óptimo de degradación de las bacterias se deben controlar las siguientes variables: cantidad de nutrientes, viabilidad, temperatura, oxígeno y pH, este último se mostró que para el proceso de degradación de la atenuación natural más hidrocarburo se estabilizó entre 5,5, mientras que para el tratamiento de bioestimulación alcanzó valores de pH de 8,3, indicándose dentro del rango en comparación con este presente estudio.

El comportamiento de los niveles de nitrógeno con respecto al suelo contaminado con 3 % de crudo de petróleo aumentó a los 60 días en el TC* y T5, mientras que disminuyó en el T1 y T3, y con respecto a una concentración del 5 % de crudo de petróleo que disminuyó a los 60 días para el TC*, T2, T4 y T6. Otiniano *et al.*, (2017) evidenciaron que la producción de ramnolípidos sobre la fuente de nitrógeno por *Pseudomonas* sp, utilizando el petróleo diesel 2, presentó que el mayor porcentaje de ramnolípidos se obtuvo cuando se empleó sulfato de amonio (0,0593 mg %), seguido por la producción en nitrato de sodio (0,0418 mg %), observándose en menor producción en presencia de urea (0,0260mg %); evidenciando así una mayor eficiencia de degradación con la adición de sulfato de amonio (92,67 %) ($p < 0,05$). Mientras que Soberón-Chávez *et al.*, (2005) explican que el sulfato de amonio es más fácil de asimilar por los microorganismos, favoreciendo su metabolismo y crecimiento; sin embargo, en ausencia de una fuente carbonada disponible se ven obligados a segregar ramnolípidos para emulsificar el petróleo y formar micelas más fáciles de asimilar. Y por último Barraza (2005), sostiene que la biodegradación de petróleo crudo y gasolina en sistemas terrestres se acelera por adición de nitrógeno y fósforo en forma de urea, lo cual indica que la producción de biosurfactantes está íntimamente ligada a la degradación de petróleo y derivados.

El comportamiento del fósforo en la presente investigación muestra que para el suelo contaminado con 3 % de crudo de petróleo, el TC* y T5, disminuyó a los 60 días, a comparación del T1 y T3 que aumentaron, y con respecto a una dosis del 5 % de crudo de petróleo en el suelo aumentó en el TC y T4, mientras que para el T2 y T6 disminuyeron, esta acción se debe a que los microorganismos necesitan de nutrientes asimilables como el fósforo para su metabolismo activo para lograr así el proceso de degradación. Similar estudio de

Samanaez (2008) evidencia que la biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo al utilizar fertilizantes inorgánicos como el nitrógeno, fósforo y potasio disminuyó su concentración a los 90 días, lo cual indica que ocurrieron procesos de mineralización e inmovilización de estos nutrientes en los terrarios. Del mismo modo Gómez *et al.* (2008) indican que el fósforo es esencial en los procesos de degradación y reproducción, gracias a la síntesis de fosfolípidos y ácidos nucleicos e interviene en la formación de compuesto dentro de las células. En lo concordante por Ñustez (2012) evaluó el efecto de la bioaumentación y bioestimulación de sedimentos contaminados con hidrocarburos, aumento los valores de fósforo en cada mesocosmos, esto se debe a una liberación de fosfatos en los procesos de metabolismo microbiano del decaimiento de la población microbiana. Finalmente, el estudio de Martínez *et al.* (2011) obtuvieron entre un 42 % y 51 % de remoción en el suelo contaminado con HTP después de 105 días, agregándole un fertilizante al suelo contaminado, mientras que el valor de atenuación natural fue de 18 % después del mismo periodo.

El comportamiento del potasio en la presente investigación muestra que para el suelo contaminado al 3 % hubo una disminución para el TC* y un aumento para T1, T3 y T5, mientras que para un suelo contaminado al 5 %, hubo una disminución para el TC, T2, T4 y T6 a los 60 días, esto puede ser debido a la acción de las enzimas involucradas en el proceso de biodegradación para catalizar diferentes reacciones. Estudio similar de Samanaez (2008) muestra que los niveles de potasio disponibles en el suelo disminuyeron con respecto a los 30, 60 y 90 días en el que ocurrieron procesos de mineralización e inmovilización en cada uno de los tratamientos. En lo encontrado por Martínez *et al.* (2011) evidencian que tuvieron como resultado una tasa remoción de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo de un 66 % al 93 % en procesos aerobios identificando al tratamiento de lodos residuales como el mejor tratamiento por la gran cantidad de nutrientes que contiene. Por último, Ñustez (2012) muestra que los niveles de potasio fueron constantes en todos los mesocosmos a través del tiempo y en la semana 14 se presentaron picos altos para todos los tratamientos, llegando a valores de 0,74 meq/100 g evidenciando que el potasio es movilizado por los microorganismos según la textura, condiciones de humedad del suelo y según sus necesidades.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

1. Las bacterias Gram negativa aisladas de cultivos orgánicos de Casa Blanca, Pachacámac corresponden a la especie *Pseudomonas fluorescens*.
2. La cepa C1 de *Pseudomonas fluorescens* extraída del nódulo de la planta de frijol, presentó la mayor actividad emulsificante de 0,904 UAE/ml, siendo una cepa potencial para las biorremediación de hidrocarburos y otros compuestos.
3. La bacteria de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* aislada e identificada de cultivos orgánicos de frijol, yuca y arracacha demostró la tolerancia el crudo de petróleo, siendo eficiente para el proceso de biorremediación suelos contaminados con crudo de petróleo en concentraciones de 3 % y 5 %, permitiendo que esta compleja fuente de carbono pueda ser transportada y solubilizada a nivel de la membrana bacteriana, para posteriormente ser utilizada como fuente de nutriente.
4. La cepa *Pseudomonas fluorescens* obtenidas en la presente investigación actuaron sobre suelo contaminado con 3 % y 5 % de crudo de petróleo en un periodo de 30 y 60 días. Siendo la cepa aislada de la raíz de la yuca la que logró un mayor porcentaje de reducción de crudo de petróleo a los 60 días, en el tratamiento T3 (3% de crudo de petróleo) en el que se alcanzó un 44,10 % de remoción, y en el tratamiento T4 (5 % de crudo de petróleo) en el que se consiguió una remoción de 85,50 %. Con los que se demuestra que estas cepas obtenidas de los sistemas radiculares de plantas pueden actuar sobre compuestos complejos como el crudo petróleo presente en el suelo.
5. En este estudio los valores de pH registrados se mantuvieron constantes dentro de un rango de 8 a 8,5 óptimo para el proceso de biorremediación de crudo de petróleo.

6. En la presente investigación, el comportamiento de los niveles de NPK en el suelo contaminado con crudo de petróleo aumentó en un 3 % y disminuyó en un 5 % a los 60 días en la mayoría de los tratamientos.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

1. El proceso de aislamiento, selección e identificación y adaptación al contaminante de la *Pseudomonas fluorescens* es uno de los procesos que es de menor costo y enriquecedor en el proceso de aprendizaje.
2. Se debe buscar otras opciones en la elaboración de cajas en donde se da el proceso de biorremediación adecuadas para lograr el adecuado volteo en cada una de las unidades experimentales.
3. Se debería probar con aislamiento de consorcios nativos de plantas de cultivos orgánicos en la biorremediación de suelos contaminados con crudo de petróleo.
4. Se debería implementar en los laboratorios de la Universidad Católica Sedes Sapientiae; planes de seguridad, calidad en el manejo de instrumentos y equipos, como de los adecuados procedimientos y calibración de cada uno de ellos.

REFERENCIAS

- Almora, G. M. (2014). *Evaluación de compatibilidad para la mezcla de petróleos crudos como carga a unidades de procesos de refinería Talara*. (Tesis de grado). Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú.
- Añez, B., Espinoza, W. y Vásquez, J. (2002). Producción de apio andino en respuesta al suministro de fertilizantes. *Revista. Forest. Venezuela*, 46(2), 39-45.
- Arizaca, M. K. (2015). *Detección del gen AlkB en bacterias con posible actividad biodegradadora, aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos*. (Tesis de grado). Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú.
- Arrieta, O. M., Rivera, A. P., Arias, L., Rojano, B. A., Ruiz, O., y Cardona, S. A. (2012). Biorremediación de un suelo con diesel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Gestión y ambiente*, 15(1), 27-40.
- Barathi, S., y Vasudevan, N. (2003). Bioremediation of crude oil contaminated soil by bioaugmentation of NS1. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 38, 1857-1866. doi: <https://doi.org/10.1081/ese-120022884>
- Barraza, C. R. (2005). *Degradación de biodiesel y diversidad bacteriana en suelos arenosos de una zona industrial*. (Tesis de grado). Universidad de Puerto Rico, Guayanila, Puerto Rico. Recuperado de <https://dire.uprm.edu/handle/20.500.11801/703>
- Bastidas, R. J., y Cedeño, R. A. (2016). *Comparación de eficiencia entre Pseudomonas aeruginosa y Pseudomonas putida, y su masificación para la remediación de hidrocarburos totales de petróleo en los pasivos ambientales de AQ-LAB en Puerto Francisco de Orellana*. (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/5660>
- Bocángel, R. C. (2016). *Evaluación de la eficacia de un consorcio bacteriano aislado en la base peruana "Machu picchu"-Antártida en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, a nivel de terrarios*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Buendía, R. H. (2013). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol. *Rev. del Instituto de Investigación (RIIGEO)*, 15(30), 123-130.

- Caballero, M. J. (2006). Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 154-151.
- Caldas, A. A. (2012). *Optimización escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido*. (Tesis de grado). Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Camilios, D., Meira, J., De Araujo, J., Mitchell, D. y Krieger, N. (2008). Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. *Rev. Microbiol Biotechnol*, 81(3), 8-441.
- Cando, R. M. (2011). *Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. (Tesis de grado). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador.
- Cantaro, S. H (2015). *Efectividad simbiótica de dos cepas de Rhizobium sp. en cuatro variedades de frijol común (Phaseolus vulgaris L.) en condiciones de costa central*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. Recuperado de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2170/P34-C355-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Carvajal, M. L., y Insuasti, A. M. (2010). *Elaboración de cerveza artesanal utilizando cebada (Hordeum vulgare) y yuca (Manihot Esculenta Crantz)*. (Tesis de grado). Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador. Recuperado de <https://pt.scribd.com/document/113840320/Tesis-Cerveza>
- Caviedes, A. D. (2010). *Aislamiento y selección de Pseudomonas sp., y Bacillus sp., promotoras del crecimiento vegetal en cultivo de Uchuva (Physalis peruviana L.) con actividad antagonica frente a Fusarium oxysporum*. (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Ceballos, H., y De la Cruz, A. G. (2002). Taxonomía y morfología de la yuca. En B. Ospina, H. Ceballos, E. Alvarez, A. C. Bellotti, L. A. Calvert, B. Arias, M. I. Cuervo, *La yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización* (págs. 16-32). Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. Recuperado de <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/55239>
- Cobo, G., Quiroz, M., y Santacruz, S. (2013). Sustitución parcial de trigo (*Triticum aestivum*) por zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* B.) en la elaboración de pan. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, 5(2), 41-44. doi: <https://doi.org/10.18272/aci.v5i2.140>

- Cruz, N. Y. (2013). *Saneamiento de aguas someras y subterráneas contaminadas con hidrocarburos del petróleo*. (Tesis de grado). Instituto Politécnico Nacional. México, D. F., México.
- Di Martino, C. (2015). *Estudio de bacterias del género Pseudomonas en la degradación de hidrocarburos y síntesis de biosurfactantes: análisis del efecto de los polihidroxicanoatos*. (Tesis de grado). Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. Recuperado de https://digital.bl.fcen.uba.ar/gsd1-282/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=Tesis_5752_DiMartino
- Debouck, D. y Hidalgo, R. (1985). Morfología de la planta de frijol común. In: López Genes, Marceliano; Fernández O., Fernando O.; Schoonhoven, Aart van (eds.). *Frijol: Investigación y producción. Programa de las Naciones Unidas (PNUD); Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia*. 7-47.
- De La Rosa, C. N., Sánchez, S. E. y Ortiz, H. L. (2014). Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas. *Revista Lactinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 5(1), 47-67.
- Duarte, N., y Figueroa, M. (2008). *Efecto de diferentes sistemas de preparación del suelo sobre las características físicas, crecimiento y rendimiento del cultivo de la yuca (Manihot esculenta Crantz) variedad en algodón en Nueva Guinea*. (Tesis de grado). Chontales, Nicaragua.
- Echevarría, L. E. (2012). *Efecto de la interacción de hongos micorrícicos arbusculares y Pseudomonas fluorescens sobre el desarrollo y la nutrición de plántulas de tomate de árbol (Solanum betaceum) durante las primeras fases de crecimiento*. (Tesis de grado). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/5518>
- El-Khawaga, M. A., Salah El-Din, R. A., Ghonem, R. A., Moussa, L. A. y Mussa, E. E. (2015). Bioremediation of petroleum oil by *Pseudomonas Aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* (biotype A) isolated from petroleum oil contaminated soil. *Egypt. J. Biotechnol.*, 50, 65-81. doi: <https://doi.org/10.13140/rg.2.1.1096.6005>
- Escalante, G. R. (2002). *Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Feijoo, R. C. (2012). *Procesamiento de la mezcla crudo y medium distillate for blending stock (mdbs) para aumentar la producción de destilados medios*. (Tesis de grado). Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú.

- Fernández, O. A; García de la Fuente, C; Saéz, N. J. y Valdezate, R. S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciones y Microbiología Clínica.
- Fernández, O. A., Gracia de la Fuente, C., Saéz, N. J. y Valdezate, R. S. (2010). Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. *Rev. Seimc*, 1(1) 6-8.
- Fernández, S. Y. (2017). *Caracterización de las fracciones sara de crudos provenientes de hidrodesintegración*. (Tesis de grado). Instituto Politécnico Nacional. México DF, México.
- Gerencia Regional de Recursos Naturales y Gestión del Medio Ambiente. (2006). *Arracacha (Arracacia xanthorrhiza Bancroft)*. Trujillo, Perú.
- Giraldo, Z. J. (2012). *Producción de ramnolipidos por Pseudomonas aeruginosa pb 25: evaluación de su actividad emulsificante y de remoción de metales pesados*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú
- Gómez, S. E., Gutiérrez, D. C., Hernández, A. M., Hernández, C. Z., Losada, M. y Mantilla, P. C. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por Pseudomonas en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova*, 6(9), 76-84. <https://doi.org/10.22490/24629448.398>
- Gordillo, B. C. (2010). Volumetría y espectroscopía para la determinación de potasio en sal comestible. Recuperado de: <https://zagan.unizar.es/record/5199/files/TAZ-PFC-2010-229.pdf>
- Guerra, G. A., Betancourth, C. A. y Salazar, C. E. (2011). Antagonismo de Pseudomonas fluorescens Migula frente a Fusarium oxysporum fsp. pisi Schtdl en arveja Pisum sativum L. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 14(2), 33-42.
- Howe-Grant, M. 1996. Petroleum. Encyclopedia of chemical technology 4th ed. Wiley Interscience Publication. New York. pp. 342-480.
- Izquierdo, R. A. (2013). *Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales*. (Tesis de grado). Universitat Barcelona, Barcelona, España.

- Kumar, V., Singh, S., Manhas, A., Singh, J., Singla, S., Kaur, P. y Kalia, A. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbon by using pseudomonas species isolated from petroleum contaminated soil. *Oriental Journal of Chemistry*, 30(4), 1771-1776. doi: <https://doi.org/10.13005/ojc/300436>
- Lacal, J. (2008). *Caracterización bioquímica y molecular del sistema de dos componentes TODS/TODT de Pseudomonas putida DOT-T1E*. (Tesis de doctorado). Universidad de Granada, Granada, España. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=71636>
- Lara, S. R., Gómez, O. L., Sandoval, T. A., Isaac, O. K. y Ramírez, D. N. (2017). Búsqueda de capacidad productora de biosurfactantes en actinobacterias haloalcalófilas y haloalcalotolerantes. *Revista Internacional Contam, Ambie.*, 33(3), 529-539.
- LLENQUE, D. L. (2011). Aislamiento e identificación de bacterias heterótrofas de suelos contaminados con petróleo provenientes de oleocentros de la ciudad de Trujillo, Perú. *Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 31(2). Recuperado de http://www.facbio.unitru.edu.pe/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=99&tmpl=component&format=raw&Itemid=149
- Maroto, A. M. y Rogel, Q. J. (2009). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *Revista Geocisa. Protección Ambiental de Suelos*. 1, 297-305.
- Martínez, P. A., Pérez, L. M., Pinto, E. J., Gurrola, N. B. y Osorio, R. A. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(3), 241-252. Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=37020226009>
- Marulanda, A. A. (2006). *Estudio de los mecanismos implicados en la resistencia de las plantas a estreses osmóticos inducidos por microorganismos autóctonos promotores del crecimiento vegetal (Hongos micorrízico arbusculares y bacterias)*. (Tesis de maestría). Universidad de Granada, Granada, España.
- Mazón, N., Castillo, R., Herman, M. y Espinoza, P. (1996). La arracacha o zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) en Ecuador. Publicación Miscelánea, Vol. 67. Quito, Ecuador: INIAP/CIP. Recuperado de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2696>
- Ministerio del Ambiente. (2015). *Guía para la elaboración de estudios de Evaluación de Riesgos a la salud y medio ambiente (ERSA) en sitios contaminados*. Recuperado de <http://www.minam.gob.pe/calidadambiental/wp-content/uploads/sites/22/2015/02/GUIA-ERSA-ALTA.compressed.pdf>

- Ministerio del Ambiente. (2016). *Glosario de términos*. Recuperado de <http://www.minam.gob.pe/calidadambiental/wp-content/uploads/sites/22/2015/02/2016-05-30-Conceptos-propuesta-Glosario.pdf>
- Montaño, A. N., Sandoval, P. A. Camargo, R. S. y Sánchez, Y. J. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Revista Elementos: Ciencia y Cultura*, 17(77), 15-33.
- Muñoz, C. S. (2016). *Evaluación de la eficacia de Trichoderma sp y Pseudomonas sp para biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. (Tesis de grado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Narváez, S., Gómez, M. L. y Martínez, M. M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del Caribe colombiano. *Bulletin of Marine and Coastal Research*, 37(1). doi: <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2008.37.1.182>
- Ñústez, C. D. (2012). *Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible*. (Tesis de maestría). Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- Okoh, A. I. (2006). Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1(2), 38-50.
- Otiniano, N. M., Benites, S. M. y Robles, H. (2017). Efecto de la fuente nitrogenada sobre la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas sp*, empleando petróleo diésel 2 como sustrato. *Scientia*, 9(1), 67-72. Recuperado de <http://revistas.ucv.edu.pe/index.php/UCV-SCIENTIA/article/view/1237>
- Palella, S. y Martins, F. (2012). Metodología de la investigación cuantitativa. Venezuela, Caracas: Editorial Universidad Pedagógica Experimental Libertador. Recuperado de <https://metodologiaecs.files.wordpress.com/2015/09/metodologc3ada-de-la-investigacic3b3n-cuantitativa-3ra-ed-2012-santa-palella-stracuzzi-feliberto-martins-pestana.pdf>
- Pardo, J. L., Perdomo, M. C. y Benavides, J. L. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Nova*, 2(2), 40-49. doi: <https://doi.org/10.22490/24629448.6>
- Peekate, P., Abu, G. y Ogugbue, C. (2018). Investigating the effectiveness between using *Pseudomonas fluorescens* and its biosurfactant in bioremediation of petroleum

hydrocarbon contaminated soil. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*, 3(2), 1-10. doi: <https://doi.org/10.9734/AJB2T/2018/40528>

Pérez, G. R. (2013). *Evaluación de tres variedades y tres distanciamientos de la siembra en el cultivo de yuca. Manihot esculenta (Geraniales; Euphorbiaceae) en el parcelamiento de caballo blanco del departamento de Retalhuleu*. (Tesis de grado). Universidad Rafael Landívar, Quetzaltenango, Guatemala.

Pérez, S., Coto, O., Echemendía, M. y Ávila, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? *Revista Protección Vegetal*, 30(3), 225-234. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30n3/rpv08315.pdf>

Pérez, M. R. (2018). *Evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando Pseudomonas fluorescens*. (Tesis de grado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15446>

Placencio, M. S. (2012). *Evaluación agronómica de cuatro morfotipos de arracacha (Arracacia xanthorrhiza), en la comunidad de Torire de la provincia Inquisivi, del departamento de la Paz*. (Tesis de grado). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.

Plants.usda.gov. (2019). *Name Search Results / USDA PLANTS*. [online] Available at: <https://plants.usda.gov/java/nameSearch> [Accessed 14 May 2019].

Ponce, C. D. (2014). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. (Tesis de grado). Universidad del Bio-Bio, Concepción, Chile.

Prescott, L., Harley, J. y Klein, D. (2004). *Microbiología*. Madrid, España: MacGraw-Hill Interamericana. Recuperado de <https://www.casadellibro.com/libro-microbiologia-5-ed/9788448605254/949237>

Prieto, V. C. (2007). *Diseño y optimización de un reactor de membrana discontinuo para la hidrólisis enzimática de proteínas*. (Tesis de maestría). Universidad de Granada. Andalucía, España.

Quiliche, D. J., Cortez, L. A., Rodríguez, G. P., Silva, V. M. y Huayna, D. L. (2016). *Aislamiento e identificación de Pseudomonas aeruginosa potencialmente degradadoras de crudo de petróleo, provenientes de suelos en talleres de automóviles en el Norte Chico*. (Tesis de grado). Universidad Nacional José Faustino Sánchez

- Ramírez, L. M. (2015). *Evaluación de rendimiento de grano y sus componentes en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo tres regímenes de riego*. (Tesis de grado). Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", Coahuila, México.
- Rockne, K. J., Chee-Sanford, J. C., Sanford, R. A., Hedlund, B. P., Staley, J. T. y Strand, S. E. (2000). Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1595-1601.
- Rodríguez, A. I. (2013). *Reciclado en suelos de lodos de refinería: Nuevas aproximaciones para la biodegradación de hidrocarburos mediante el manejo de enmiendas orgánicas*. (Tesis de grado). Universidad de Murcia, Murcia, España.
- Ruiz, M. L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos*. (Tesis de maestría). Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
- Samanaez, G. E. (2008). *Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Sediyama, M., Casali, V., Cardoso, A. y Silva, R. (1990). Germinacao de sementes de mandioquinha-salsa tratadas con fungicidas- nitrato de potasio e ácido sulfúrico. *Revista Horticultura Brasileira*, 8(2), 17-18.
- Seminario, J. (2004). *Raíces andinas : contribuciones al conocimiento y a la capacitación*. Lima, Perú: International Potato Center.
- Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. (2012). *Manual de observaciones fenológicas*. Recuperado de <https://www.senamhi.gob.pe/load/file/01401SENA-11.pdf>
- Schoebitz, C. M. (2006). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo , género *Azospirillum* spp.)*. (Tesis de grado). Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

- Silva, J. (2014). *Modelación matemática de los procesos de degradación de nitrógeno, en el humedal superficial de agua libre Tancat de la Pipa, en L'Albufera de Valencia, España*. (Tesis de grado). Maracay, España.
- SlidePlayer. (2015). Obtenido de <http://slideplayer.com/slide/3922362/>
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F. y Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), 718-725. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0150-3>
- Suárez, L., y Mederos, V. R. (2011). Revisión bibliográfica apuntes sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) tendencias actuales. *Cultivos tropicales*, 32(3), 27-35. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193222357004>
- Toribio-Jiménez, J., Velázquez, J. C., Romero, Y., Rodríguez, M. A., Chávez, J. D., Guevara, J. y Fierro, A. (2014). *Pseudomonas* sp. productoras de biosurfactantes. *Tlamati*, 5(2).
- Torres, D. K. y Zuluaga, M. T. (2009). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. (Tesis de grado). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Ulloa, A. L. (2011). *Efecto biocontrolador de Pseudomonas fluorescens sobre dos especies de hongos fitopatógenos del género Fusarium sp.* (Tesis de grado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
- Ulloa, J. A., Rosas, P., Ramírez, J. C. y Ulloa, B. E. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente Año*, 3(8), 5-9. Recuperada de https://www.researchgate.net/publication/268406171_El_frijol_Phaseolus_vulgaris_s_u_importancia_nutricional_y_como_fuente_de_fitoquimicos
- Uribe, D., Ortiz, E., Portillo, M., Bautista, G. y Cerón, J. (1999). Diversidad de pseudomonas fluorescentes en cultivos de papa de la region Cundiboyacense y su actividad antagonista in vitro sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2(1), 50-58.
- Valladares, C. A. (2010). *Taxonomía y botánica de los cultivos de grano*. Universidad Autónoma de Honduras, La Ceiba, Honduras. Recuperado de http://institutorubino.edu.uy/materiales/Federico_Franco/6toBot/unidad-ii-taxonomia-botanica-y-fisiologia-de-los-cultivos-de-grano-agosto-2010.pdf

Villanueva, E. D. (2010). *Evaluación de seis variedades de frijol (Phaseolus vulgaris L.) bajo condiciones de cultivo tradicional en localidades de Chimaltenango y Sololá.* (Tesis de grado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Xylem Analytics Germany Sales GmbH y Co. KG WTW. (2018). Alyza IQ: Medida del ortofosfato y el amonio directamente en la cuenca. Folleto 8. [online] Available at: https://www.xylemanalytics.com/File%20Library/Resource%20Library/WTW/04%20Flyers%20Brochures/ESP/Folleto_8_Alyza-IQ_732-KB_ES-pdf.pdf [Accessed 27 Sep 2019].

TERMINOLOGÍA

Microorganismo: Se agrupan en dos categorías: procariotas (bacterias y archaeas) y eucariotas (hongos, algas y protozoarios), varían a partir en términos morfológicos, estructurales, funcionales, su capacidad de adaptación, metabolismo y en la división celular (Montaño *et al.*, 2010).

Contaminación: Movimiento o combinación de un contaminante (sustancia química) a un sitio (suelo, agua o aire), afectando a la salud de las personas o como al del ambiente y en algunos casos irreversibles (Ministerio del Ambiente [MINAM], 2016)

Suelo contaminado: Es un suelo que ha sido modificado con el tiempo sus características físicas, químicas y biológicas por la presencia de contaminantes producto de las diferentes actividades que realiza el hombre, según lo indicado en el D.S. N° 002-2013-MINAM (MINAM, 2016).

Derrames: Es un vertido, descarga de un contaminante hacia una fuente (agua o suelo) de manera accidental o de una práctica inadecuada (MINAM, 2016).

Monitoreo: Implica la recolección, análisis, evaluación sistemática y comparables de muestras ambientales en un determinado espacio y tiempo, con la finalidad de medir la presencia y concentración de un contaminante en el ambiente (MINAM, 2016)

Enzimas: Consideradas proteínas con propiedades que catalizan reacciones químicas que tienen lugar en el interior de la célula, estas aumentan la velocidad de las reacciones químicas y son altamente específicos y deben tener las condiciones adecuadas como de la temperatura, pH y son específicas a un sustrato (Prieto, 2007).

Emulsificación: Una de las características que presentan los microorganismos es su capacidad para producir biosurfactantes con propiedades emulsificantes que tiene la finalidad de aumentar la solubilidad del hidrocarburo policíclicos aromáticos o derivadas del petróleo y su biodisponibilidad (Lara *et al.*, 2017).

Biosurfactante: Son un grupo de moléculas microbianas que presentan dos partes diferentes una hidrofóbica y otra hidrofílica, son tensoactivas que presentan menor toxicidad y mayor bidegradabilidad (De La Rosa *et al.*, 2014).

Muestreo: Es el proceso donde se selecciona un conjunto de muestras tomadas convenientemente en una fuente, mezcladas y transportadas al laboratorio para su respectivo análisis (Ministerio del Ambiente [MINAM], 2015)

Rizósfera: Es la interacción de una comunidad de bacterias y hongos adyacente a la raíz de las plantas, en donde las raíces liberan cantidades de compuestos orgánicos como azúcares o aminoácidos que favorecen al crecimiento de la planta y propician que se activen los mecanismos de defensa y se expresen respuestas bioquímicas (Marulanda, 2006)

Pruebas bioquímicas: Estas pruebas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias, algunas de estas pruebas son rápidas y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas y otras requieren de incubación previa, estas son pruebas que detectan componentes metabólicos o que son sensibles a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar (Fernández *et al.*, 2010).

Dosis: Es el nivel de cantidad de una sustancia que se introduce en el proceso biológico o metabólico (MINAM, 2015).

APÉNDICES

Apéndice 1. Registro del porcentaje de reducción de crudo de petróleo

Cepa	TC=Tratamiento Control				<i>Pseudomonas fluorescens</i> del frijol				<i>Pseudomonas fluorescens</i> de la yuca				<i>Pseudomonas fluorescens</i> de la arracacha			
	TC*		TC		T1		T2		T3		T4		T5		T6	
Crudo de petróleo																
Días	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
R1	0,279	2,61	2	4	0,811	2,503	3,305	3,894	1,446	2,373	3,381	4,031	0,972	1,519	1,885	3,095
R2	0,467	2,608	2,063	4,435	1,096	2,201	3,254	3,818	1,362	2,351	3,745	4,418	0,499	1,423	1,877	3,254
R3	0,656	2,027	2,13	3,803	1,31	2,162	3,449	3,85	1,235	1,977	3,965	4,532	0,349	1,398	1,6	3,647
R4	0,815	1,908	2,085	4,45	1,523	2,1	3,297	4,085	1,252	1,409	3,963	4,119	0,475	1,383	1,882	3,26

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 2. Registro de los niveles de pH

Cepa	Tratamiento Control				<i>Pseudomonas fluorescens</i> del frijol				<i>Pseudomonas fluorescens</i> de la yuca				<i>Pseudomonas fluorescens</i> de la arracacha			
	TC*		TC		T1		T2		T3		T4		T5		T6	
Crudo de petróleo	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
Días	83,775	7,71	78,825	84,225	81,125	8,02	8,285	7,905	8,155	8,145	7,86	82,825	8,11	80,325	80,325	8,1
R1	8,45	7,98	8,525	8,385	8	7,96	81,825	81,025	81,675	8,11	7,86	82,775	8,265	82,225	8,21	82,825
R2	81,525	8,205	84,175	84,275	8,2	8,165	8,04	80,875	8,205	8,165	8,195	83,925	8,175	7,98	8,15	82,875
R3	83,225	84,075	8	85,275	8,115	81,325	81,675	8,145	8,06	83,175	8,085	83,175	81,075	82,675	8,25	82,225
R4																

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 3. Registro de los niveles de nitrógeno

Cepa	Tratamiento Control				<i>Pseudomonas fluorescens</i> del frijol				<i>Pseudomonas fluorescens</i> de la yuca				<i>Pseudomonas fluorescens</i> de la arracacha				
	TC*		TC		T1		T2		T3		T4		T5		T6		
Crudo de petróleo																	
Días	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	
R1	13,52	14,67	12,73	12,023	8,86	6,24	14,57	13,625	12,53	10,87	14,75	13,9	7,5	9,86	13,06	12,1	
R2	13,56	14,23	12,7	12	8,89	6,25	14,56	13,665	12,55	10,7	14,73	13,94	7,46	9,87	13,04	12,11	
R3	13,51	14,22	12,74	12,03	8,8	6,28	14,59	13,66	12,48	10,85	14,72	13,94	7,49	9,87	13,07	12,07	
R4	13,53	12,76	14,04	12,01	8,87	6,23	14,58	13,662	12,57	10,75	14,77	13,93	7,46	9,89	13,08	12,09	

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 4. Registro de los niveles de fósforo

Cepa	Tratamiento Control				<i>Pseudomonas fluorescens</i> del frijol				<i>Pseudomonas fluorescens</i> de la yuca				<i>Pseudomonas fluorescens</i> de la arracacha			
	TC*		TC		T1		T2		T3		T4		T5		T6	
Crudo de petróleo																
Días	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
R1	0,22	0,145	0,09	0,178	0,08	0,139	0,176	0,13	0,085	0,12	0,09	0,156	0,14	0,147	0,247	0,08
R2	0,25	0,137	0,13	0,18	0,097	0,145	0,18	0,109	0,088	0,099	0,13	0,171	0,15	0,157	0,245	0,09
R3	0,234	0,12	0,11	0,169	0,12	0,15	0,175	0,11	0,09	0,098	0,11	0,18	0,18	0,17	0,239	0,12
R4	0,23	0,15	0,08	0,176	0,11	0,148	0,169	0,1	0,12	0,11	0,099	0,176	0,179	0,148	0,25	0,13

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 5. Registro de los niveles de potasio

Cepa	Tratamiento Control				<i>Pseudomonas fluorescens</i> del frijol				<i>Pseudomonas fluorescens</i> de la yuca				<i>Pseudomonas fluorescens</i> de la arracacha			
	TC*		TC		T1		T2		T3		T4		T5		T6	
Crudo de petróleo																
Días	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
R1	82,4	54,21	53,09	20,4	57,87	58,99	51,2	50,59	53,78	56,57	51,63	50,74	78,84	86,86	59,23	57,29
R2	82,39	53,88	53,51	20,59	57,9	58,93	50,98	50,6	54,1	56,48	51,52	50,89	79,26	86,78	58,98	57,31
R3	82,45	53,97	53,25	20,38	58,03	59,05	51,21	50,54	53,75	56,56	51,55	50,9	78,79	87,09	59,35	57,28
R4	81,9	54,09	53,28	20,45	57,92	59,25	50,98	50,5	53,75	56,79	51,69	50,77	79,4	86,58	59,34	57,3

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 6. Registro del conteo de colonias

Cepa	Tratamiento Control				<i>Pseudomonas fluorescens</i> del frijol				<i>Pseudomonas fluorescens</i> de la yuca				<i>Pseudomonas fluorescens</i> de la arracacha			
	TC*		TC		T1		T2		T3		T4		T5		T6	
Crudo de petróleo	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
R1	1310000	2550000	159	14700	26300	274000	25000	298000	238000	2800	29100	2800	28500	27000	26000	256000
	000	0	0	0	0	0000	0	0	00	00	00	00	0	00	00	000
R2	1295000	253000	159	14800	26400	275000	25100	297000	239000	2810	29000	2790	28400	26900	25890	255000
	000	0	2	0	0	0000	0	0	00	00	00	00	0	00	00	000
R3	1300000	254000	158	14700	26400	273000	24990	298000	237000	2790	28900	2780	28700	27100	26100	257000
	000	0	9	0	0	0000	0	0	00	00	00	00	0	00	00	000
R4	1320000	257000	159	14500	26300	274000	25000	297000	237000	2800	29200	2800	28600	27000	26000	256000
	000	0	0	0	0	0000	0	0	00	00	00	00	0	00	00	000

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 7. Resultados de ANOVA del porcentaje de remoción de crudo de petróleo

Fuente de Variación	SC	G.L	C.M	F	P
Intercept	367,1535	1	367,1535	6268,902	0,000000
Dosis	56,7988	1	56,7988	969,802	0,000000
Días	20,8895	1	20,8895	356,674	0,000000
Tratamiento	10,6510	3	3,5503	60,619	0,000000
Dosis*Días	0,0481	1	0,0481	0,821	0,369480
Dosis*Tratamiento	1,3649	3	0,4550	7,768	0,000250
Días*Tratamiento	4,2489	3	1,4163	24,183	0,000000
Dosis*Días*Tratamiento	0,8358	3	0,2786	4,757	0,005536
Error	2,8112	48	0,0586		

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 8. Prueba de Tukey del porcentaje de remoción del crudo de petróleo

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Tratamiento Control*	Tratamiento Control	-1,7250*	,12837	,000	-2,1317	-1,3183
	Tratamiento 1	-,3900	,12837	,069	-,7967	,0167
	Tratamiento 2	-2,1963*	,12837	,000	-2,6030	-1,7895
	Tratamiento 3	-,2525	,12837	,514	-,6592	,1542
	Tratamiento 4	-2,5963*	,12837	,000	-3,0030	-2,1895
	Tratamiento 5	,4213*	,12837	,037	,0145	,8280
	Tratamiento 6	-1,1400*	,12837	,000	-1,5467	-,7333
Tratamiento Control	Tratamiento Control*	1,7250*	,12837	,000	1,3183	2,1317
	Tratamiento 1	1,3350*	,12837	,000	,9283	1,7417
	Tratamiento 2	-,4712*	,12837	,013	-,8780	-,0645
	Tratamiento 3	1,4725*	,12837	,000	1,0658	1,8792
	Tratamiento 4	-,8713*	,12837	,000	-1,2780	-,4645
	Tratamiento 5	2,1463*	,12837	,000	1,7395	2,5530
	Tratamiento 6	,5850*	,12837	,001	,1783	,9917
Tratamiento 1	Tratamiento Control*	,3900	,12837	,069	-,0167	,7967
	Tratamiento Control	-1,3350*	,12837	,000	-1,7417	-,9283
	Tratamiento 2	-1,8063*	,12837	,000	-2,2130	-1,3995
	Tratamiento 3	,1375	,12837	,960	-,2692	,5442
	Tratamiento 4	-2,2063*	,12837	,000	-2,6130	-1,7995
	Tratamiento 5	,8113*	,12837	,000	,4045	1,2180
	Tratamiento 6	-,7500*	,12837	,000	-1,1567	-,3433
Tratamiento 2	Tratamiento Control*	2,1963*	,12837	,000	1,7895	2,6030

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
	Tratamiento Control	,4712*	,12837	,013	,0645	,8780
	Tratamiento 1	1,8063*	,12837	,000	1,3995	2,2130
	Tratamiento 3	1,9438*	,12837	,000	1,5370	2,3505
	Tratamiento 4	-,4000	,12837	,057	-,8067	,0067
	Tratamiento 5	2,6175*	,12837	,000	2,2108	3,0242
	Tratamiento 6	1,0563*	,12837	,000	,6495	1,4630
Tratamiento 3	Tratamiento Control*	,2525	,12837	,514	-,1542	,6592
	Tratamiento Control	-1,4725*	,12837	,000	-1,8792	-1,0658
	Tratamiento 1	-,1375	,12837	,960	-,5442	,2692
	Tratamiento 2	-1,9438*	,12837	,000	-2,3505	-1,5370
	Tratamiento 4	-2,3438*	,12837	,000	-2,7505	-1,9370
	Tratamiento 5	,6738*	,12837	,000	,2670	1,0805
Tratamiento 4	Tratamiento 6	-,8875*	,12837	,000	-1,2942	-,4808
	Tratamiento Control*	2,5963*	,12837	,000	2,1895	3,0030
	Tratamiento Control	,8713*	,12837	,000	,4645	1,2780
	Tratamiento 1	2,2063*	,12837	,000	1,7995	2,6130
	Tratamiento 2	,4000	,12837	,057	-,0067	,8067
	Tratamiento 3	2,3438*	,12837	,000	1,9370	2,7505
Tratamiento 5	Tratamiento 5	3,0175*	,12837	,000	2,6108	3,4242
	Tratamiento 6	1,4563*	,12837	,000	1,0495	1,8630
	Tratamiento Control*	-,4213*	,12837	,037	-,8280	-,0145
	Tratamiento Control	-2,1463*	,12837	,000	-2,5530	-1,7395
	Tratamiento 1	-,8113*	,12837	,000	-1,2180	-,4045
	Tratamiento 2	-2,6175*	,12837	,000	-3,0242	-2,2108
	Tratamiento 3	-,6738*	,12837	,000	-1,0805	-,2670

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
	Tratamiento 4	-3,0175*	,12837	,000	-3,4242	-2,6108
	Tratamiento 6	-1,5613*	,12837	,000	-1,9680	-1,1545
Tratamiento 6	Tratamiento Control*	1,1400*	,12837	,000	,7333	1,5467
	Tratamiento Control	-,5850*	,12837	,001	-,9917	-,1783
	Tratamiento 1	,7500*	,12837	,000	,3433	1,1567
	Tratamiento 2	-1,0563*	,12837	,000	-1,4630	-,6495
	Tratamiento 3	,8875*	,12837	,000	,4808	1,2942
	Tratamiento 4	-1,4563*	,12837	,000	-1,8630	-1,0495
	Tratamiento 5	1,5613*	,12837	,000	1,1545	1,9680

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .066.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 9. Valores promedios y desviación estándar (\pm DS) del porcentaje de reducción de crudo de petróleo en los tratamientos a dosis de crudo de petróleo (3 % y 5 %) evaluados a los 30 y 60 días.

Tratamientos	Periodo	
	30 días	60 días
TC *	0,554 \pm 0,232 %	2,288 \pm 0,373 %
TC	2,053 \pm 0,083 %	4,243 \pm 0,302 %
T1	1,185 \pm 0,304 %	2,241 \pm 0,179 %
T2	3,326 \pm 0,084 %	3,911 \pm 0,119 %
T3	1,323 \pm 0,099 %	2,027 \pm 0,450 %
T4	3,763 \pm 0,275 %	4,275 \pm 0,238 %
T5	0,573 \pm 0,273 %	1,43 \pm 0,061 %
T6	1,811 \pm 0,140 %	3,314 \pm 0,234 %

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 10. Resultados de ANOVA del pH

Fuente de Variación	SC	G.L.	C.M	F	P
Intercept	4275,566	1	4275,566	207407,2	0,000000
Dosis	0,036	1	0,036	1,7	0,194157
Días	0,012	1	0,012	0,6	0,453785
Tratamiento	0,211	3	0,070	3,4	0,024554
Dosis*Días	0,158	1	0,158	7,7	0,008024
Dosis*Tratamiento	0,036	3	0,012	0,6	0,6262273
Días*Tratamiento	0,136	3	0,045	2,2	0,099416
Dosis*Días*Tratamiento	0,171	3	0,057	2,8	0,052345
Error	0,989	48	0,021		

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 11. Prueba de Tukey de los niveles de pH

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Tratamiento Control*	Tratamiento Control	-,1000	,07366	,871	-,3334	,1334
	Tratamiento 1	,1125	,07366	,789	-,1209	,3459
	Tratamiento 2	,0850	,07366	,941	-,1484	,3184
	Tratamiento 3	,0325	,07366	1,000	-,2009	,2659
	Tratamiento 4	,0412	,07366	,999	-,1921	,2746
	Tratamiento 5	,0550	,07366	,995	-,1784	,2884
	Tratamiento 6	,0100	,07366	1,000	-,2234	,2434
Tratamiento Control	Tratamiento Control*	,1000	,07366	,871	-,1334	,3334
	Tratamiento 1	,2125	,07366	,098	-,0209	,4459
	Tratamiento 2	,1850	,07366	,215	-,0484	,4184
	Tratamiento 3	,1325	,07366	,624	-,1009	,3659
	Tratamiento 4	,1412	,07366	,546	-,0921	,3746
	Tratamiento 5	,1550	,07366	,427	-,0784	,3884
	Tratamiento 6	,1100	,07366	,807	-,1234	,3434
Tratamiento 1	Tratamiento Control*	-,1125	,07366	,789	-,3459	,1209
	Tratamiento Control	-,2125	,07366	,098	-,4459	,0209
	Tratamiento 2	-,0275	,07366	1,000	-,2609	,2059
	Tratamiento 3	-,0800	,07366	,957	-,3134	,1534
	Tratamiento 4	-,0713	,07366	,977	-,3046	,1621
	Tratamiento 5	-,0575	,07366	,993	-,2909	,1759
	Tratamiento 6	-,1025	,07366	,857	-,3359	,1309

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
Tratamiento 2	Tratamiento Control*	-,0850	,07366	,941	-,3184	,1484
	Tratamiento Control	-,1850	,07366	,215	-,4184	,0484
	Tratamiento 1	,0275	,07366	1,000	-,2059	,2609
	Tratamiento 3	-,0525	,07366	,996	-,2859	,1809
	Tratamiento 4	-,0437	,07366	,999	-,2771	,1896
	Tratamiento 5	-,0300	,07366	1,000	-,2634	,2034
	Tratamiento 6	-,0750	,07366	,969	-,3084	,1584
Tratamiento 3	Tratamiento Control*	-,0325	,07366	1,000	-,2659	,2009
	Tratamiento Control	-,1325	,07366	,624	-,3659	,1009
	Tratamiento 1	,0800	,07366	,957	-,1534	,3134
	Tratamiento 2	,0525	,07366	,996	-,1809	,2859
	Tratamiento 4	,0087	,07366	1,000	-,2246	,2421
	Tratamiento 5	,0225	,07366	1,000	-,2109	,2559
	Tratamiento 6	-,0225	,07366	1,000	-,2559	,2109
Tratamiento 4	Tratamiento Control*	-,0412	,07366	,999	-,2746	,1921
	Tratamiento Control	-,1412	,07366	,546	-,3746	,0921
	Tratamiento 1	,0713	,07366	,977	-,1621	,3046
	Tratamiento 2	,0437	,07366	,999	-,1896	,2771
	Tratamiento 3	-,0087	,07366	1,000	-,2421	,2246
	Tratamiento 5	,0137	,07366	1,000	-,2196	,2471
	Tratamiento 6	-,0312	,07366	1,000	-,2646	,2021
Tratamiento 5	Tratamiento Control*	-,0550	,07366	,995	-,2884	,1784
	Tratamiento Control	-,1550	,07366	,427	-,3884	,0784
	Tratamiento 1	,0575	,07366	,993	-,1759	,2909
	Tratamiento 2	,0300	,07366	1,000	-,2034	,2634

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
	Tratamiento 3	-,0225	,07366	1,000	-,2559	,2109
	Tratamiento 4	-,0137	,07366	1,000	-,2471	,2196
	Tratamiento 6	-,0450	,07366	,999	-,2784	,1884
Tratamiento 6	Tratamiento Control*	-,0100	,07366	1,000	-,2434	,2234
	Tratamiento Control	-,1100	,07366	,807	-,3434	,1234
	Tratamiento 1	,1025	,07366	,857	-,1309	,3359
	Tratamiento 2	,0750	,07366	,969	-,1584	,3084
	Tratamiento 3	,0225	,07366	1,000	-,2109	,2559
	Tratamiento 4	,0312	,07366	1,000	-,2021	,2646
	Tratamiento 5	,0450	,07366	,999	-,1884	,2784

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .022.

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 12. Resultados de ANOVA de los niveles de nitrógeno

Fuente de Variación	SC	G.L.	C.M.	F	P
Intercept	9063,159	1	9063,159	127021,4	0,000000
Dosis	142,101	1	142,101	1991,6	0,000000
Días	6,900	1	6,900	96,7	0,000000
Tratamiento	88,166	3	29,389	411,9	0,000000
Dosis*Días	1,247	1	1,247	17,5	0,000122
Dosis*Tratamiento	125,512	3	41,837	586,4	0,000000
Días*Tratamiento	14,454	3	4,818	67,5	0,000000
Dosis*Días*Tratamiento	15,945	3	5,315	74,5	0,000000
Error	3,425	48	0,071		

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 13. Prueba de Tukey de los niveles de nitrógeno

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de			Intervalo de confianza al 95%	
		medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Límite inferior	Límite superior
Tratamiento Control*	Tratamiento Control	1,2163*	,13355	,000	,7931	1,6394
	Tratamiento 1	6,1975*	,13355	,000	5,7744	6,6206
	Tratamiento 2	-,3650	,13355	,138	-,7881	,0581
	Tratamiento 3	2,0875*	,13355	,000	1,6644	2,5106
	Tratamiento 4	-,5850*	,13355	,002	-1,0081	-,1619
	Tratamiento 5	5,0750*	,13355	,000	4,6519	5,4981
	Tratamiento 6	1,1725*	,13355	,000	,7494	1,5956
Tratamiento Control	Tratamiento Control*	-1,2163*	,13355	,000	-1,6394	-,7931
	Tratamiento 1	4,9812*	,13355	,000	4,5581	5,4044
	Tratamiento 2	-1,5813*	,13355	,000	-2,0044	-1,1581
	Tratamiento 3	,8712*	,13355	,000	,4481	1,2944
	Tratamiento 4	-1,8012*	,13355	,000	-2,2244	-1,3781
	Tratamiento 5	3,8587*	,13355	,000	3,4356	4,2819
	Tratamiento 6	-,0438	,13355	1,000	-,4669	,3794
Tratamiento 1	Tratamiento Control*	-6,1975*	,13355	,000	-6,6206	-5,7744
	Tratamiento Control	-4,9812*	,13355	,000	-5,4044	-4,5581
	Tratamiento 2	-6,5625*	,13355	,000	-6,9856	-6,1394
	Tratamiento 3	-4,1100*	,13355	,000	-4,5331	-3,6869
	Tratamiento 4	-6,7825*	,13355	,000	-7,2056	-6,3594
	Tratamiento 5	-1,1225*	,13355	,000	-1,5456	-,6994
	Tratamiento 6	-5,0250*	,13355	,000	-5,4481	-4,6019
Tratamiento 2	Tratamiento Control*	,3650	,13355	,138	-,0581	,7881
	Tratamiento Control	1,5813*	,13355	,000	1,1581	2,0044

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
	Tratamiento 1	6,5625*	,13355	,000	6,1394	6,9856
	Tratamiento 3	2,4525*	,13355	,000	2,0294	2,8756
	Tratamiento 4	-,2200	,13355	,720	-,6431	,2031
	Tratamiento 5	5,4400*	,13355	,000	5,0169	5,8631
	Tratamiento 6	1,5375*	,13355	,000	1,1144	1,9606
Tratamiento 3	Tratamiento Control*	-2,0875*	,13355	,000	-2,5106	-1,6644
	Tratamiento Control	-,8712*	,13355	,000	-1,2944	-,4481
	Tratamiento 1	4,1100*	,13355	,000	3,6869	4,5331
	Tratamiento 2	-2,4525*	,13355	,000	-2,8756	-2,0294
	Tratamiento 4	-2,6725*	,13355	,000	-3,0956	-2,2494
	Tratamiento 5	2,9875*	,13355	,000	2,5644	3,4106
	Tratamiento 6	-,9150*	,13355	,000	-1,3381	-,4919
Tratamiento 4	Tratamiento Control*	,5850*	,13355	,002	,1619	1,0081
	Tratamiento Control	1,8012*	,13355	,000	1,3781	2,2244
	Tratamiento 1	6,7825*	,13355	,000	6,3594	7,2056
	Tratamiento 2	,2200	,13355	,720	-,2031	,6431
	Tratamiento 3	2,6725*	,13355	,000	2,2494	3,0956
	Tratamiento 5	5,6600*	,13355	,000	5,2369	6,0831
	Tratamiento 6	1,7575*	,13355	,000	1,3344	2,1806
Tratamiento 5	Tratamiento Control*	-5,0750*	,13355	,000	-5,4981	-4,6519
	Tratamiento Control	-3,8587*	,13355	,000	-4,2819	-3,4356
	Tratamiento 1	1,1225*	,13355	,000	,6994	1,5456
	Tratamiento 2	-5,4400*	,13355	,000	-5,8631	-5,0169
	Tratamiento 3	-2,9875*	,13355	,000	-3,4106	-2,5644
	Tratamiento 4	-5,6600*	,13355	,000	-6,0831	-5,2369

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de			Intervalo de confianza al 95%	
		medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Límite inferior	Límite superior
	Tratamiento 6	-3,9025*	,13355	,000	-4,3256	-3,4794
Tratamiento 6	Tratamiento Control*	-1,1725*	,13355	,000	-1,5956	-,7494
	Tratamiento Control	,0438	,13355	1,000	-,3794	,4669
	Tratamiento 1	5,0250*	,13355	,000	4,6019	5,4481
	Tratamiento 2	-1,5375*	,13355	,000	-1,9606	-1,1144
	Tratamiento 3	,9150*	,13355	,000	,4919	1,3381
	Tratamiento 4	-1,7575*	,13355	,000	-2,1806	-1,3344
	Tratamiento 5	3,9025*	,13355	,000	3,4794	4,3256

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .071.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 14. Resultados de ANOVA de los niveles de fósforo

Fuente de Variación	SC	G.L.	C.M.	F	P
Intercept	1,360431	1	1,360431	6714,895	0,000000
Dosis	0,000749	1	0,000749	3,699	0,060392
Días	0,003235	1	0,003235	15,966	0,000221
Tratamiento	0,024539	3	0,008180	40,374	0,000000
Dosis*Días	0,000088	1	0,000088	0,434	0,513270
Dosis*Tratamiento	0,016303	3	0,005434	26,823	0,000000
Días*Tratamiento	0,024781	3	0,008260	40,771	0,000000
Dosis*Días*Tratamiento	0,060309	3	0,020103	99,226	0,000000
Error	0,009725	48	0,000203		

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 15. Prueba de Tukey de los niveles de fósforo

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Tratamiento Control*	Tratamiento Control	,0463*	,00705	,000	,0239	,0686
	Tratamiento 1	,0613*	,00705	,000	,0389	,0836
	Tratamiento 2	,0412*	,00705	,000	,0189	,0636
	Tratamiento 3	,0838*	,00705	,000	,0614	,1061
	Tratamiento 4	,0462*	,00705	,000	,0239	,0686
	Tratamiento 5	,0262*	,00705	,011	,0039	,0486
	Tratamiento 6	,0100	,00705	,845	-,0123	,0323
Tratamiento Control	Tratamiento Control*	-,0463*	,00705	,000	-,0686	-,0239
	Tratamiento 1	,0150	,00705	,413	-,0073	,0373
	Tratamiento 2	-,0050	,00705	,996	-,0273	,0173
	Tratamiento 3	,0375*	,00705	,000	,0152	,0598
	Tratamiento 4	,0000	,00705	1,000	-,0223	,0223
	Tratamiento 5	-,0200	,00705	,110	-,0423	,0023
	Tratamiento 6	-,0363*	,00705	,000	-,0586	-,0139
Tratamiento 1	Tratamiento Control*	-,0613*	,00705	,000	-,0836	-,0389
	Tratamiento Control	-,0150	,00705	,413	-,0373	,0073
	Tratamiento 2	-,0200	,00705	,110	-,0423	,0023
	Tratamiento 3	,0225*	,00705	,047	,0002	,0448
	Tratamiento 4	-,0150	,00705	,413	-,0373	,0073
	Tratamiento 5	-,0350*	,00705	,000	-,0573	-,0127
	Tratamiento 6	-,0512*	,00705	,000	-,0736	-,0289

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
Tratamiento 2	Tratamiento Control*	-,0412*	,00705	,000	-,0636	-,0189
	Tratamiento Control	,0050	,00705	,996	-,0173	,0273
	Tratamiento 1	,0200	,00705	,110	-,0023	,0423
	Tratamiento 3	,0425*	,00705	,000	,0202	,0648
	Tratamiento 4	,0050	,00705	,996	-,0173	,0273
	Tratamiento 5	-,0150	,00705	,413	-,0373	,0073
Tratamiento 3	Tratamiento 6	-,0312*	,00705	,001	-,0536	-,0089
	Tratamiento Control*	-,0838*	,00705	,000	-,1061	-,0614
	Tratamiento Control	-,0375*	,00705	,000	-,0598	-,0152
	Tratamiento 1	-,0225*	,00705	,047	-,0448	-,0002
	Tratamiento 2	-,0425*	,00705	,000	-,0648	-,0202
	Tratamiento 4	-,0375*	,00705	,000	-,0598	-,0152
Tratamiento 4	Tratamiento 5	-,0575*	,00705	,000	-,0798	-,0352
	Tratamiento 6	-,0738*	,00705	,000	-,0961	-,0514
	Tratamiento Control*	-,0462*	,00705	,000	-,0686	-,0239
	Tratamiento Control	,0000	,00705	1,000	-,0223	,0223
	Tratamiento 1	,0150	,00705	,413	-,0073	,0373
	Tratamiento 2	-,0050	,00705	,996	-,0273	,0173
Tratamiento 5	Tratamiento 3	,0375*	,00705	,000	,0152	,0598
	Tratamiento 5	-,0200	,00705	,110	-,0423	,0023
	Tratamiento 6	-,0362*	,00705	,000	-,0586	-,0139
	Tratamiento Control*	-,0262*	,00705	,011	-,0486	-,0039
	Tratamiento Control	,0200	,00705	,110	-,0023	,0423
	Tratamiento 1	,0350*	,00705	,000	,0127	,0573
	Tratamiento 2	,0150	,00705	,413	-,0073	,0373

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Tratamiento 6	Tratamiento 3	,0575*	,00705	,000	,0352	,0798
	Tratamiento 4	,0200	,00705	,110	-,0023	,0423
	Tratamiento 6	-,0162	,00705	,313	-,0386	,0061
Tratamiento 6	Tratamiento Control*	-,0100	,00705	,845	-,0323	,0123
	Tratamiento Control	,0363*	,00705	,000	,0139	,0586
	Tratamiento 1	,0512*	,00705	,000	,0289	,0736
	Tratamiento 2	,0312*	,00705	,001	,0089	,0536
	Tratamiento 3	,0738*	,00705	,000	,0514	,0961
	Tratamiento 4	,0362*	,00705	,000	,0139	,0586
	Tratamiento 5	,0162	,00705	,313	-,0061	,0386

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .000.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 16. Resultados de ANOVA del nivel de potasio

Fuente de Variación	SC	G.L.	C.M.	F	P
Intercept	213435,9	1	213435,9	8642406	0,00
Dosis	4578,0	1	4578,0	185373	0,00
Días	693,7	1	693,7	28090	0,00
Tratamiento	3564,2	3	1188,1	48107	0,00
Dosis*Días	94,6	1	94,6	3831	0,00
Dosis*Tratamiento	2076,7	3	692,2	28030	0,00
Días*Tratamiento	3074,6	3	1024,9	41499	0,00
Dosis*Días*Tratamiento	35,4	3	11,8	477	0,00
Error	1,2	48	0,0		

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 17. Prueba de Tukey de los niveles de potasio

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Tratamiento Control*	Tratamiento Control	31,2925*	,07858	,000	31,0436	31,5414
	Tratamiento 1	9,6688*	,07858	,000	9,4198	9,9177
	Tratamiento 2	17,3363*	,07858	,000	17,0873	17,5852
	Tratamiento 3	12,9388*	,07858	,000	12,6898	13,1877
	Tratamiento 4	16,9500*	,07858	,000	16,7011	17,1989
	Tratamiento 5	-14,7887*	,07858	,000	-15,0377	-14,5398
	Tratamiento 6	9,9013*	,07858	,000	9,6523	10,1502
Tratamiento Control	Tratamiento Control*	-31,2925*	,07858	,000	-31,5414	-31,0436
	Tratamiento 1	-21,6238*	,07858	,000	-21,8727	-21,3748
	Tratamiento 2	-13,9563*	,07858	,000	-14,2052	-13,7073
	Tratamiento 3	-18,3537*	,07858	,000	-18,6027	-18,1048
	Tratamiento 4	-14,3425*	,07858	,000	-14,5914	-14,0936
	Tratamiento 5	-46,0813*	,07858	,000	-46,3302	-45,8323
	Tratamiento 6	-21,3913*	,07858	,000	-21,6402	-21,1423
Tratamiento 1	Tratamiento Control*	-9,6688*	,07858	,000	-9,9177	-9,4198
	Tratamiento Control	21,6238*	,07858	,000	21,3748	21,8727
	Tratamiento 2	7,6675*	,07858	,000	7,4186	7,9164
	Tratamiento 3	3,2700*	,07858	,000	3,0211	3,5189
	Tratamiento 4	7,2813*	,07858	,000	7,0323	7,5302
	Tratamiento 5	-24,4575*	,07858	,000	-24,7064	-24,2086
	Tratamiento 6	,2325	,07858	,083	-,0164	,4814
Tratamiento 2	Tratamiento Control*	-17,3363*	,07858	,000	-17,5852	-17,0873
	Tratamiento Control	13,9563*	,07858	,000	13,7073	14,2052

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
	Tratamiento 1	-7,6675*	,07858	,000	-7,9164	-7,4186
	Tratamiento 3	-4,3975*	,07858	,000	-4,6464	-4,1486
	Tratamiento 4	-,3862*	,07858	,000	-,6352	-,1373
	Tratamiento 5	-32,1250*	,07858	,000	-32,3739	-31,8761
	Tratamiento 6	-7,4350*	,07858	,000	-7,6839	-7,1861
Tratamiento 3	Tratamiento Control*	-12,9388*	,07858	,000	-13,1877	-12,6898
	Tratamiento Control	18,3537*	,07858	,000	18,1048	18,6027
	Tratamiento 1	-3,2700*	,07858	,000	-3,5189	-3,0211
	Tratamiento 2	4,3975*	,07858	,000	4,1486	4,6464
	Tratamiento 4	4,0112*	,07858	,000	3,7623	4,2602
	Tratamiento 5	-27,7275*	,07858	,000	-27,9764	-27,4786
	Tratamiento 6	-3,0375*	,07858	,000	-3,2864	-2,7886
Tratamiento 4	Tratamiento Control*	-16,9500*	,07858	,000	-17,1989	-16,7011
	Tratamiento Control	14,3425*	,07858	,000	14,0936	14,5914
	Tratamiento 1	-7,2813*	,07858	,000	-7,5302	-7,0323
	Tratamiento 2	,3862*	,07858	,000	,1373	,6352
	Tratamiento 3	-4,0112*	,07858	,000	-4,2602	-3,7623
	Tratamiento 5	-31,7388*	,07858	,000	-31,9877	-31,4898
	Tratamiento 6	-7,0488*	,07858	,000	-7,2977	-6,7998
Tratamiento 5	Tratamiento Control*	14,7887*	,07858	,000	14,5398	15,0377
	Tratamiento Control	46,0813*	,07858	,000	45,8323	46,3302
	Tratamiento 1	24,4575*	,07858	,000	24,2086	24,7064
	Tratamiento 2	32,1250*	,07858	,000	31,8761	32,3739
	Tratamiento 3	27,7275*	,07858	,000	27,4786	27,9764
	Tratamiento 4	31,7388*	,07858	,000	31,4898	31,9877

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)			Intervalo de confianza al 95%	
			Error estándar	Sig.	Límite inferior	Límite superior
	Tratamiento 6	24,6900*	,07858	,000	24,4411	24,9389
Tratamiento 6	Tratamiento Control*	-9,9013*	,07858	,000	-10,1502	-9,6523
	Tratamiento Control	21,3913*	,07858	,000	21,1423	21,6402
	Tratamiento 1	-,2325	,07858	,083	-,4814	,0164
	Tratamiento 2	7,4350*	,07858	,000	7,1861	7,6839
	Tratamiento 3	3,0375*	,07858	,000	2,7886	3,2864
	Tratamiento 4	7,0488*	,07858	,000	6,7998	7,2977
	Tratamiento 5	-24,6900*	,07858	,000	-24,9389	-24,4411

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .025.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 18. Resultados de ANOVA del conteo de colonias

Fuente de Variación	SC	G.L.	C.M.	F	P
Intercept	4,711633E+18	1	4,711633E+18	396227,3	0,00
Dosis	3,630823E+18	1	3,630823E+18	305336,0	0,00
Días	6,960548E+17	1	6,960548E+17	58535,1	0,00
Tratamiento	4,597606E+18	3	1,532535E+18	128879,4	0,00
Dosis*Días	3,371597E+17	1	3,371597E+17	28353,6	0,00
Dosis*Tratamiento	5,638892E+18	3	1,879631E+18	158068,5	0,00
Días*Tratamiento	8,590424E+18	3	2,863475E+18	240805,4	0,00
Dosis*Días*Tratamiento	8,917522E+18	3	2,972507E+18	249974,6	0,00
Error	5,707794E+14	48	1,189124E+13		

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 19. Prueba de Tukey del conteo de colonias

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Tratamiento Control*	Tratamiento Control	654324579,8750*	1731947,57728	,000	648837276,5110	659811883,2390
	Tratamiento 1	-715733000,0000*	1731947,57728	,000	-721220303,3640	-710245696,6360
	Tratamiento 2	652786137,5000*	1731947,57728	,000	647298834,1360	658273440,8640
	Tratamiento 3	642371250,0000*	1731947,57728	,000	636883946,6360	647858553,3640
	Tratamiento 4	653131750,0000*	1731947,57728	,000	647644446,6360	658619053,3640
	Tratamiento 5	652906000,0000*	1731947,57728	,000	647418696,6360	658393303,3640
	Tratamiento 6	525098875,0000*	1731947,57728	,000	519611571,6360	530586178,3640
Tratamiento Control	Tratamiento Control*	-654324579,8750*	1731947,57728	,000	-659811883,2390	-648837276,5110
	Tratamiento 1	-	1731947,57728	,000	-	-
		1370057579,8750*	1731947,57728	,000	1375544883,2390	1364570276,5110
	Tratamiento 2	-1538442,3750	1731947,57728	,986	-7025745,7390	3948860,9890
	Tratamiento 3	-11953329,8750*	1731947,57728	,000	-17440633,2390	-6466026,5110
	Tratamiento 4	-1192829,8750	1731947,57728	,997	-6680133,2390	4294473,4890
	Tratamiento 5	-1418579,8750	1731947,57728	,991	-6905883,2390	4068723,4890
Tratamiento 1	Tratamiento 6	-129225704,8750*	1731947,57728	,000	-134713008,2390	-123738401,5110
	Tratamiento Control*	715733000,0000*	1731947,57728	,000	710245696,6360	721220303,3640
	Tratamiento Control	1370057579,8750*	1731947,57728	,000	1364570276,5110	1375544883,2390
	Tratamiento 2	1368519137,5000*	1731947,57728	,000	1363031834,1360	1374006440,8640
	Tratamiento 3	1358104250,0000*	1731947,57728	,000	1352616946,6360	1363591553,3640
	Tratamiento 4	1368864750,0000*	1731947,57728	,000	1363377446,6360	1374352053,3640
	Tratamiento 5	1368639000,0000*	1731947,57728	,000	1363151696,6360	1374126303,3640

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Tratamiento 2	Tratamiento 6	1240831875,0000*	1731947,57728	,000	1235344571,6360	1246319178,3640
	Tratamiento Control*	-652786137,5000*	1731947,57728	,000	-658273440,8640	-647298834,1360
	Tratamiento Control	1538442,3750	1731947,57728	,986	-3948860,9890	7025745,7390
	Tratamiento 1	-	1731947,57728	,000	-	-
		1368519137,5000*	1731947,57728	,000	1374006440,8640	1363031834,1360
	Tratamiento 3	-10414887,5000*	1731947,57728	,000	-15902190,8640	-4927584,1360
	Tratamiento 4	345612,5000	1731947,57728	1,000	-5141690,8640	5832915,8640
Tratamiento 3	Tratamiento 5	119862,5000	1731947,57728	1,000	-5367440,8640	5607165,8640
	Tratamiento 6	-127687262,5000*	1731947,57728	,000	-133174565,8640	-122199959,1360
	Tratamiento Control*	-642371250,0000*	1731947,57728	,000	-647858553,3640	-636883946,6360
	Tratamiento Control	11953329,8750*	1731947,57728	,000	6466026,5110	17440633,2390
	Tratamiento 1	-	1731947,57728	,000	-	-
		1358104250,0000*	1731947,57728	,000	1363591553,3640	1352616946,6360
	Tratamiento 2	10414887,5000*	1731947,57728	,000	4927584,1360	15902190,8640
Tratamiento 4	Tratamiento 4	10760500,0000*	1731947,57728	,000	5273196,6360	16247803,3640
	Tratamiento 5	10534750,0000*	1731947,57728	,000	5047446,6360	16022053,3640
	Tratamiento 6	-117272375,0000*	1731947,57728	,000	-122759678,3640	-111785071,6360
	Tratamiento Control*	-653131750,0000*	1731947,57728	,000	-658619053,3640	-647644446,6360
	Tratamiento Control	1192829,8750	1731947,57728	,997	-4294473,4890	6680133,2390
	Tratamiento 1	-	1731947,57728	,000	-	-
		1368864750,0000*	1731947,57728	,000	1374352053,3640	1363377446,6360
	Tratamiento 2	-345612,5000	1731947,57728	1,000	-5832915,8640	5141690,8640
	Tratamiento 3	-10760500,0000*	1731947,57728	,000	-16247803,3640	-5273196,6360
	Tratamiento 5	-225750,0000	1731947,57728	1,000	-5713053,3640	5261553,3640
	Tratamiento 6	-128032875,0000*	1731947,57728	,000	-133520178,3640	-122545571,6360

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Tratamiento 5	Tratamiento Control*	-652906000,0000*	1731947,57728	,000	-658393303,3640	-647418696,6360
	Tratamiento Control	1418579,8750	1731947,57728	,991	-4068723,4890	6905883,2390
	Tratamiento 1	-	1731947,57728	,000	-	-
		1368639000,0000*			1374126303,3640	1363151696,6360
	Tratamiento 2	-119862,5000	1731947,57728	1,000	-5607165,8640	5367440,8640
	Tratamiento 3	-10534750,0000*	1731947,57728	,000	-16022053,3640	-5047446,6360
	Tratamiento 4	225750,0000	1731947,57728	1,000	-5261553,3640	5713053,3640
Tratamiento 6	Tratamiento 6	-127807125,0000*	1731947,57728	,000	-133294428,3640	-122319821,6360
	Tratamiento Control*	-525098875,0000*	1731947,57728	,000	-530586178,3640	-519611571,6360
	Tratamiento Control	129225704,8750*	1731947,57728	,000	123738401,5110	134713008,2390
	Tratamiento 1	-	1731947,57728	,000	-	-
		1240831875,0000*			1246319178,3640	1235344571,6360
	Tratamiento 2	127687262,5000*	1731947,57728	,000	122199959,1360	133174565,8640
	Tratamiento 3	117272375,0000*	1731947,57728	,000	111785071,6360	122759678,3640
	128032875,0000*	1731947,57728	,000	122545571,6360	133520178,3640	
	Tratamiento 4	127807125,0000*	1731947,57728	,000	122319821,6360	133294428,3640

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 11998569641823.010.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 20. Informe de análisis de suelos - caracterización



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRÍCOLA

DEPARTAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DRH
LABORATORIO DE AGUA, SUELO, MEDIO AMBIENTE Y FERTIRRIEGO
 Av. La Molina s/n Teléfono: 614 7800 Anexo 226 Lima Email: las-fia@lamolina.edu.pe
ANÁLISIS DE SUELO - CARACTERIZACIÓN



SOLICITANTE : PAOLA NORKA LUDEÑA MENDEZ
 PROYECTO : TESIS
 PROCEDENCIA : Promart - Lima
 RESP. ANALISIS : Ing. Elizabeth Monterrey Porras
 FECHA DE ANALISIS : La Molina, 07 de marzo de 2018

Número de muestra		CE dS / m Relación 1:1	Análisis Mecánico				pH Relación 1:1	M.O. %	P ppm	K ppm	CaCO ₃ %	Cationes Cambiables					
Lab.	Campo		Arena %	Limo %	Arcilla %	Textura						CIC total	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	Al ⁺⁺⁺ +H ⁺
13686	Suelo	3.92	70.54	17.50	11.96	Franco arenoso	7.94	4.80	100.53	2700.00	2.76	12.44	9.20	1.16	0.28	1.79	-

Microelementos	
N (%)	0.20

LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUA Y SUELO
 Ing. Msc. Teresa Velásquez Bejarano
 JEFE DE LABORATORIO



Fuente: Universidad Agraria La Molina

Apéndice 21. Conteo inicial de bacterias *Pseudomonas fluorescens* para su inoculación en cada uno de los tratamientos

Tratamientos	Conteo inicial de Bact/ml
TC*	1.42 x10 ⁸
TC	2.13 x10 ⁸
T1	2.62 x10 ⁹
T2	2.35 x10 ⁹
T3	2.97 x10 ⁷
T4	3.12 x10 ⁷
T5	2.92 x10 ⁹
T6	3.10 x10 ⁸

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 22. Datos de procedencia de la muestra de crudo de petróleo.

Datos	
Cliente	BPZ EQP SRL/Pacific Rubiales Energy
Ol	227168
Vol/Cantidad	+/- 50,000 Bbls
Identificación de muestra Número	08420
Nombre del producto/grado	Corvina Crude Oil
Estación de terminal	Refinería de Talara – Boyas de mar
Fecha de muestra	01 de marzo del 2015
Tipo de muestra	Compuesta
Nombre del barco	BIT-Revel
Tanque Número	3,5 P/S

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 23. Características del contenido de la muestra de crudo Corvina.

Propiedad	Crudo Corvina
Procedencia	Zona Norte Perú
Gravedad API	23,2 grados
Gravedad específica	0,9147
BSW %	0,05
Viscosidad cinemática (cSt. @ 122° F)	11,17
Contenido de azufre (% m/m)	0,20 %
Metales:	
• Níquel	7,3 ppm
• Vanadio	1,2 ppm
Asfaltenos	< 1 % m/m

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 24. Registro fotográfico de la investigación



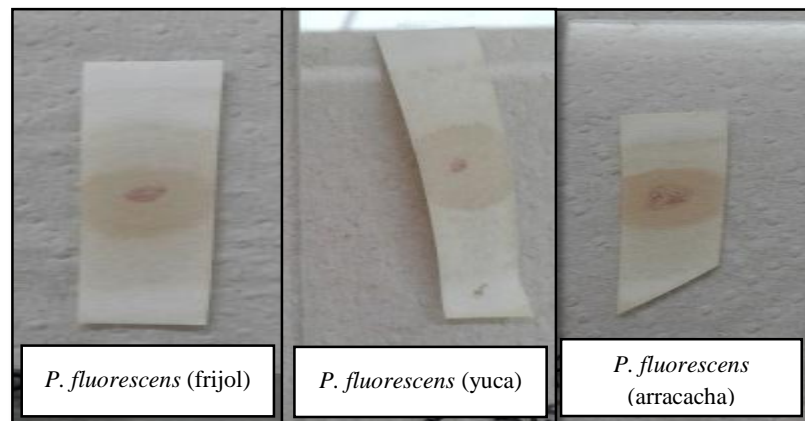
Distribución del medio King B en placas Petri.



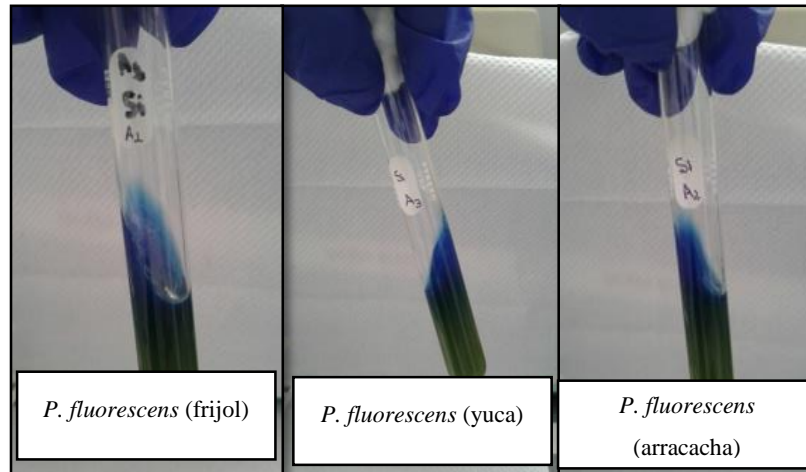
Siembra de la bacteria en placas Petri.



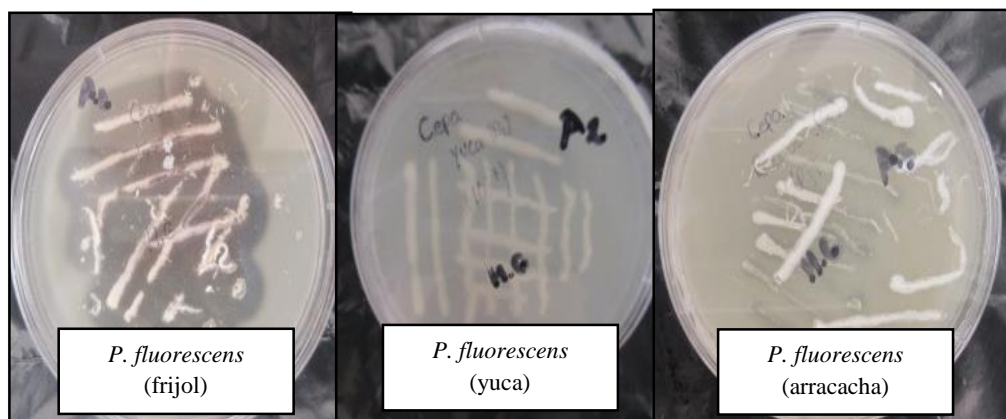
Resultados de la prueba catalasa a los diferentes nódulos de las raíces del frijol, yuca y arracacha.



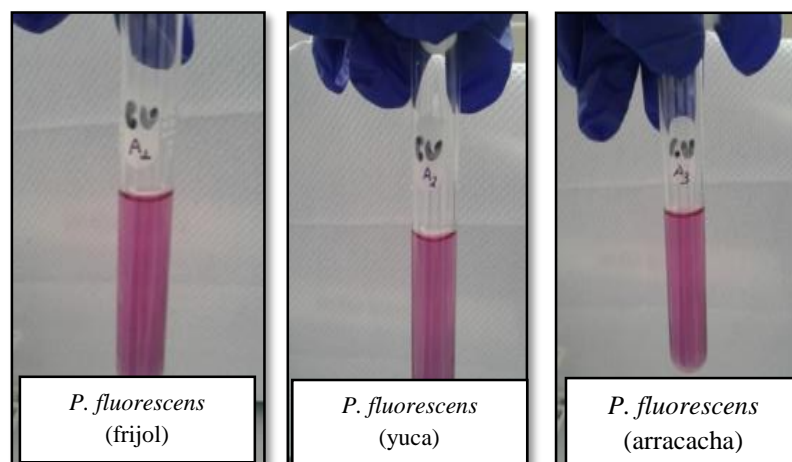
Resultados de la prueba oxidasa a las *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la raíz de frijol, yuca y arracacha.



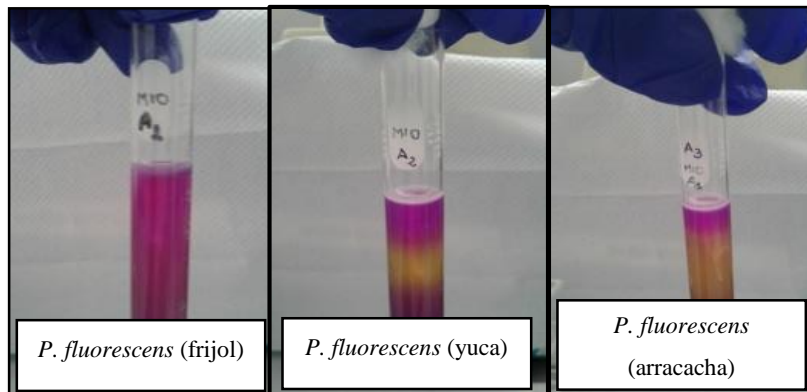
Resultados de la prueba de citrato a las *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la raíz de frijol, yuca y arracacha.



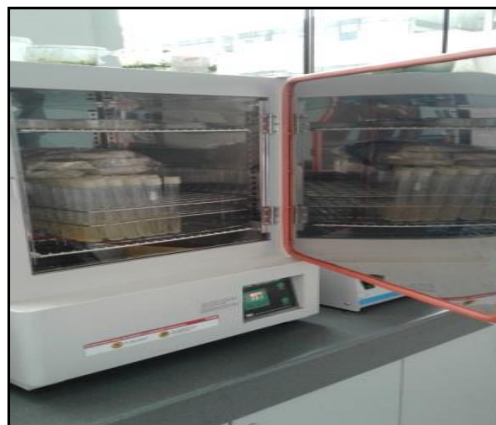
Resultados de la prueba de hidrólisis de gelatina a las *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la raíz de frijol, yuca y arracacha.



Resultados de la prueba de ureasa a las *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la raíz de frijol, yuca y arracacha.



Resultados de la prueba de motilidad a las *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la raíz de frijol, yuca y arracacha.



Incubación de las bacterias para su adaptación al crudo de petróleo a diferentes concentraciones.

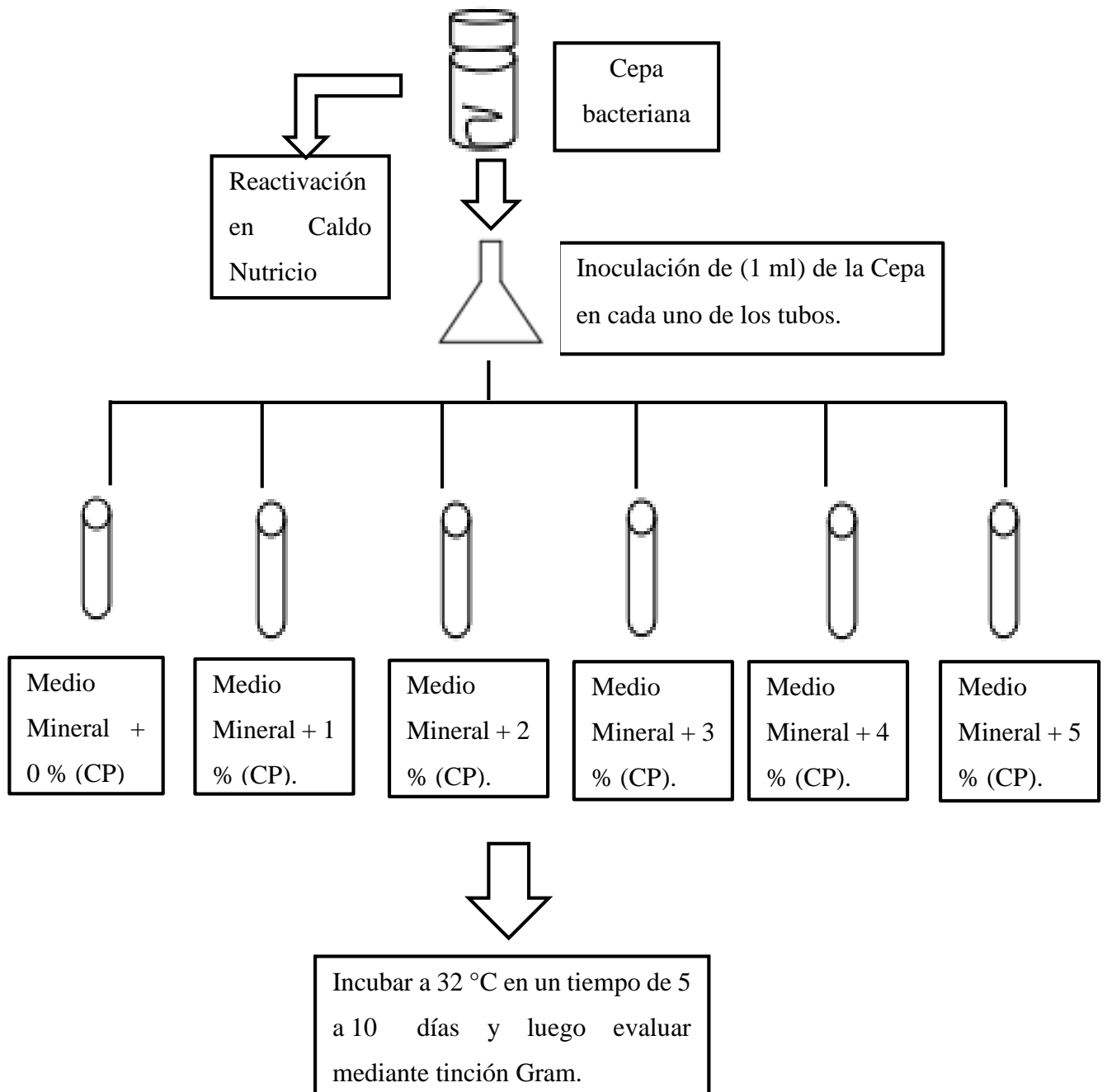


Proceso de bioaumentación de la *Pseudomonas fluorescens* adaptada para cada uno de las unidades experimentales.



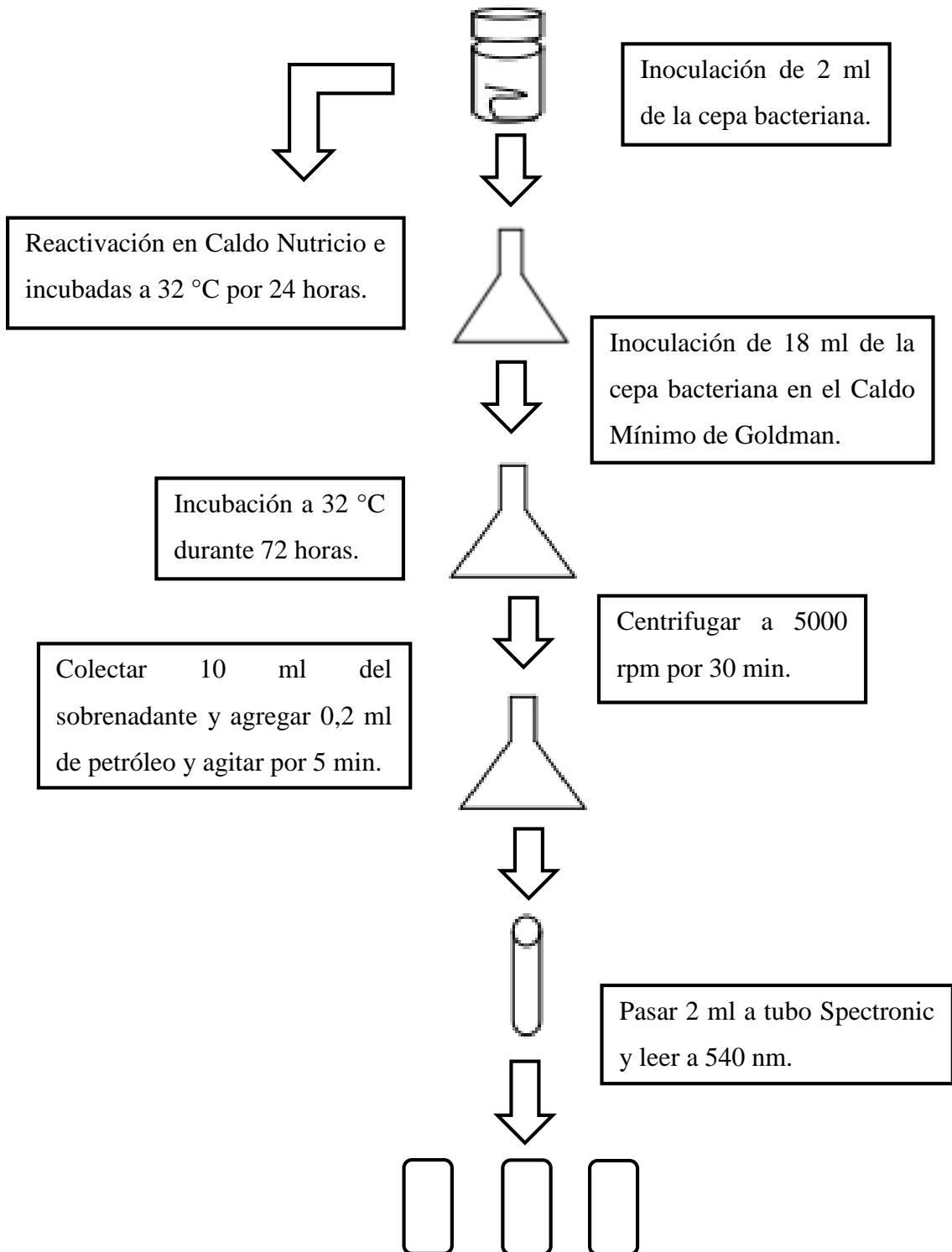
Proceso de inoculación del crudo de petróleo a cada una de las unidades experimentales.

Apéndice 25. Selección de bacterias del género *Pseudomonas* con potencial degradador de hidrocarburos.



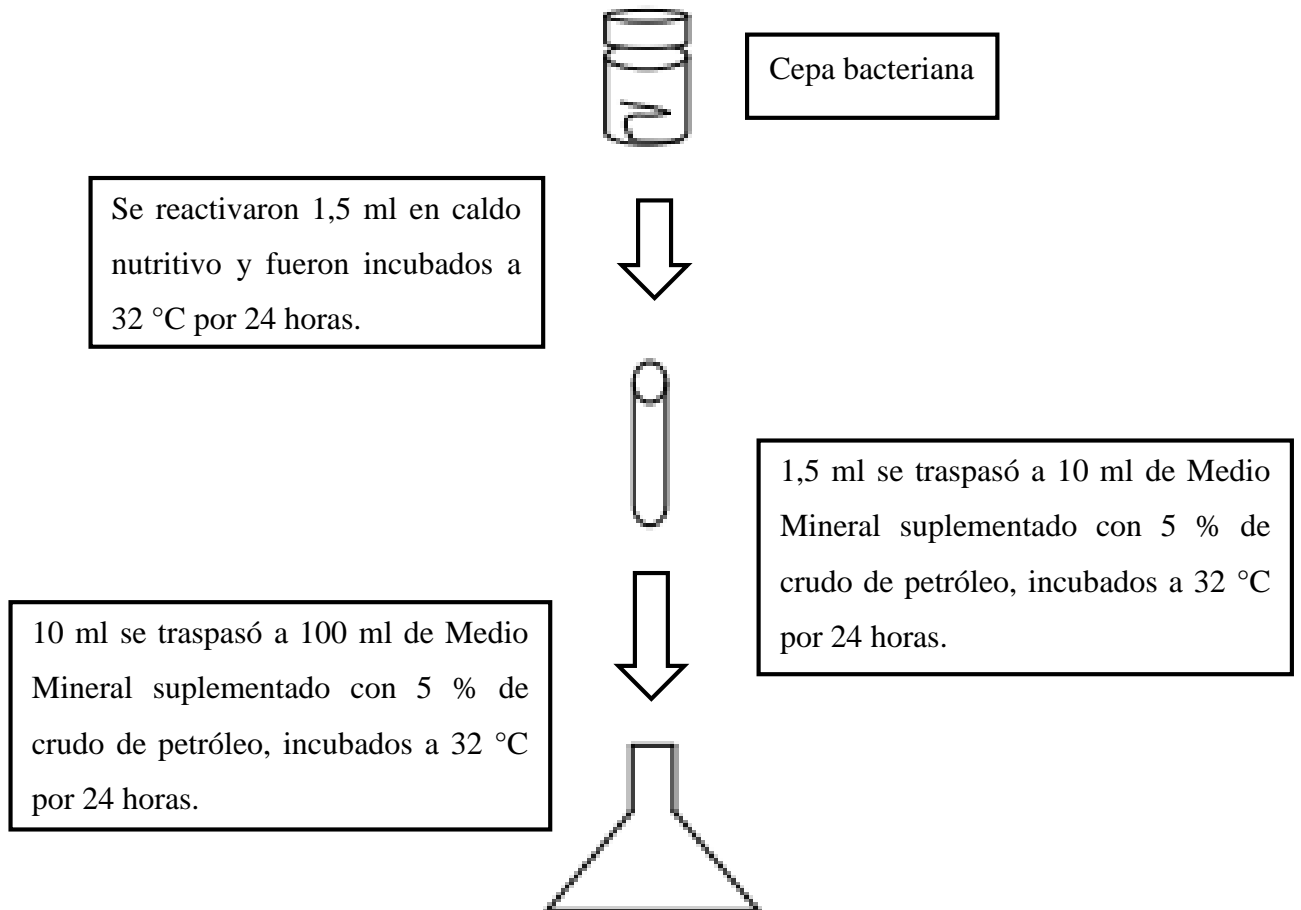
Nota: Este procedimiento se realizó para cada una de las cepas bacterianas aisladas.

Apéndice 26. Evaluación de la capacidad emulsificante de las cepas seleccionadas con potencial degradador de hidrocarburos.



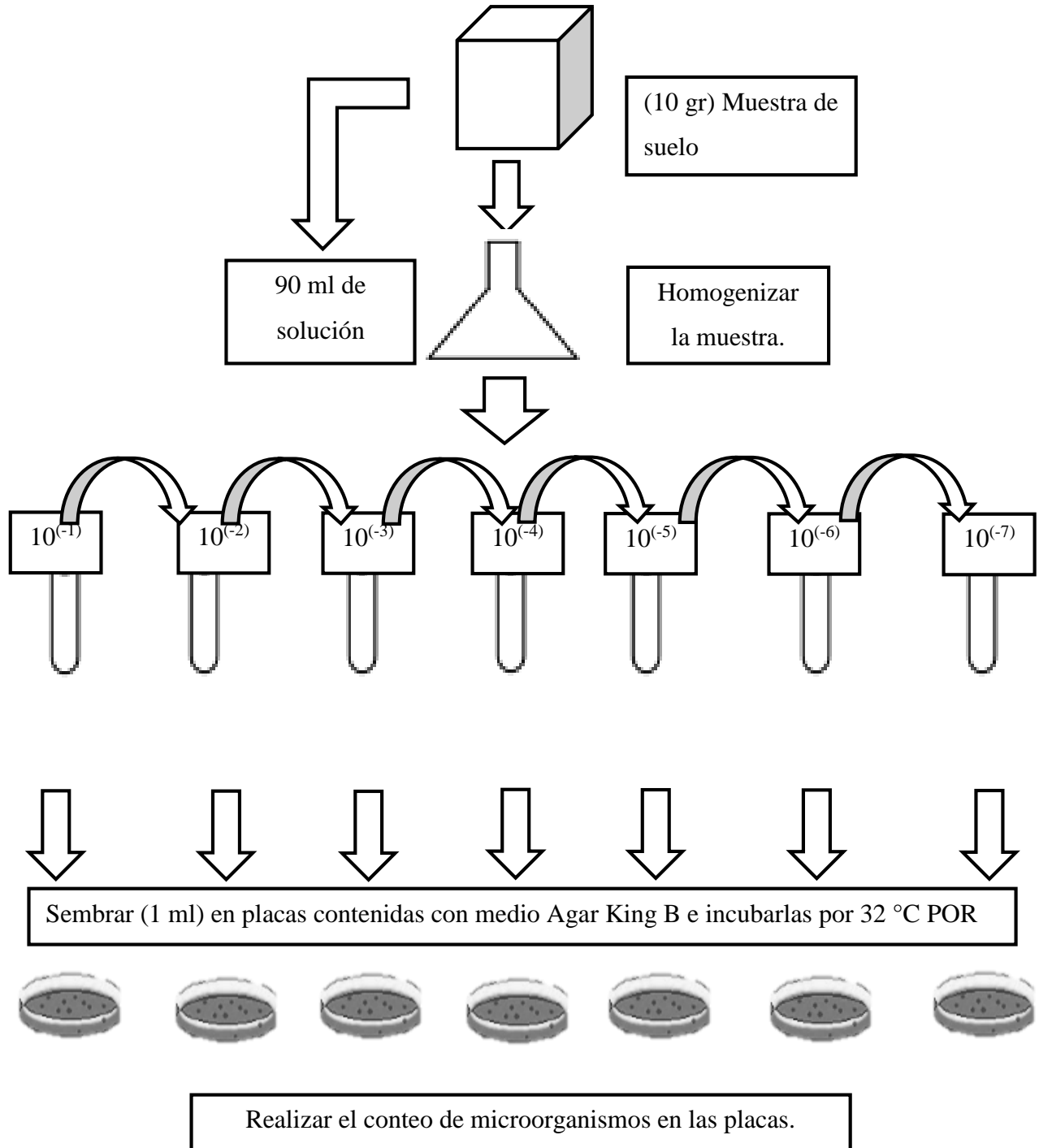
Nota: Este procedimiento se realizó para cada una de las cepas bacterianas aisladas.

Apéndice 27. Obtención del inóculo bacteriano de las cepas seleccionadas del género *Pseudomonas fluorescens* por bioaumentación.



Nota: Este procedimiento se realizó para cada una de las cepas bacterianas aisladas.

Apéndice 28. Recuento de bacterias oleofílicas.



Nota: Este procedimiento se realizó para cada una de las cepas bacterianas aisladas.

Apéndice 29. Evaluación del porcentaje de reducción de crudo petróleo al 3 % y al 5 % en los tratamientos a los 30 y 60 días.

Pesar 10 gr suelo homogenizado de las muestras de cada unidad experimental.



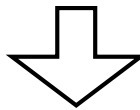
Colocar en un cartucho (envuelto en papel filtro) y colocarlo en la pieza del dispositivo de extracción de Soxhlet.



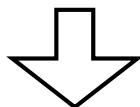
El matraz que se encuentra en el desecador se llena con 250 ml de Alcohol Etílico al 99%, se pesa antes y después del llenado.



El Alcohol Etílico una vez que alcanza su temperatura de ebullición, se evapora y llega al refrigerante condensándose y cayendo en el compartimiento del cartucho donde se encuentra la muestra.



Se realiza la cantidad de pasadas hasta que no se pinte de color amarillo la pieza del medio del dispositivo de extracción de Soxhlet.



Se retira el matraz y se vuelve a pesar, y se da el cálculo del porcentaje de grasa.

Apéndice 30. Protocolo de Ensayo de Nitrógeno Total (N)

Nitrógeno (total)

No. del programa

35



WTW Modelo No.:	14537
Categoría:	KT (ensayo de reactivos con cubeta)
Cubeta:	16 mm
Rango de medición:	0,50 - 15,00 mg/l N

Observación: Antes de ejecutar por primera vez, determinar el valor en blanco del reactivo.



Agregar 10,0 ml de muestra en una cubeta vacía.



Agregar 1 cuchara micrométrica azul rasa de N-1K.



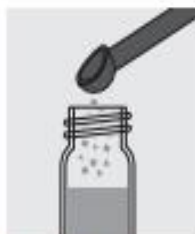
Añadir 6 gotas de N-2K y cerrar la cubeta con el tapón roscado y mezclar.



Calentar la cubeta en la unidad térmica durante 1 hora a 120 °C.



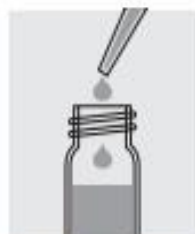
Colocar la cubeta nuevamente en el soporte y dejar que se enfríe a temperatura ambiente (**=muestra preparada**).



Añadir 1 cuchara micrométrica azul rasa de N-3K en una cubeta de reacción y cerrar la cubeta con el tapón roscado.



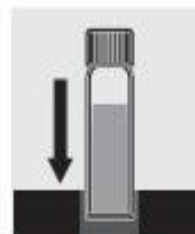
Sacudir la cubeta enérgicamente durante **1 minuto para disolver el material sólido**.



Agregar muy lentamente 1,5 ml de la muestra preparada con la pipeta, cerrar la cubeta con el tapón roscado y mezclar enérgicamente. **Cuidado, la cubeta se calienta mucho!**



Dejar en reposo durante 10 minutos.



Colocar la cubeta en el compartimiento del fotómetro e iniciar la medición.

Observaciones:

- Recomendamos, por cada paquete abierto de un juego de ensayos, determinar el nuevo valor en blanco de reactivos (agua desionizada, en lugar de la muestra).
- Las soluciones de la muestra y los reactivos deben tener una temperatura de 20-25 °C. En caso necesario, tempere a la temperatura adecuada.
- Vea más detalles en el papel informativo en el empaque del test.

Apéndice 31. Protocolo de Ensayo de Fósforo (P)

Fosfato

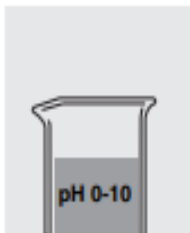
No. del programa

23



a xylem brand

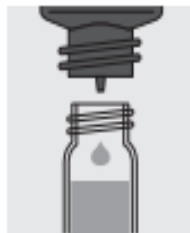
WTW Modelo No.:	14848
Categoría:	RT (ensayo de reactivos)
Cubeta:	16 mm
Rango de medición:	0.05 - 3.00 mg/l PO ₄ -P
	0.15 - 9.20 mg/l PO ₄
	Indicación posible en mmol/l



Verificar el valor pH de la muestra.
Rango nominal: pH 0-10.
En caso necesario, corregir con ácido clorhídrico diluido.



Llenar con una pipeta 5,0 ml de la muestra en una cubeta vacía.



Agregar 5 gotas de PO₄-1 y mezclar.



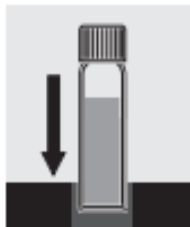
Agregar 1 cuchara micrométrica azul rasa de PO₄-2 y cerrar la cubeta con el tapón roscado.



Sacudir enérgicamente para diluir las sustancias sólidas.



Dejar en reposo durante 5 minutos.



Colocar la cubeta en el compartimiento del fotómetro e iniciar la medición.

Observaciones:

- Recomendamos, por cada paquete abierto de un juego de ensayos, determinar el nuevo valor en blanco de reactivos (agua desionizada, en lugar de la muestra).
- Este ensayo cubre únicamente el ortofosfato.
- Vea más detalles en el papel informativo en el empaque del test.

Apéndice 32. Protocolo de Ensayo de Potasio (K)

Potasio

No. del programa

56



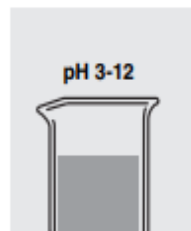
a xylem brand

WTW Modelo No.:	14562
Categoría:	KT (ensayo de reactivos con cubeta)
Cubeta:	16 mm
Rango de medición:	5,00 - 50,00 mg/l K
	Indicación posible en mmol/l

Observación: Antes de ejecutar por primera vez, determinar el valor en blanco del reactivo.



Filtrar las soluciones turbias.



Verificar el valor pH de la muestra.
Rango nominal: pH 3-12.
En caso necesario, corregir con lejía de sosa diluida o con ácido sulfúrico diluido.



Llenar con una pipeta 2,0 ml de la muestra en una cubeta de reacción, cerrar con el tapón roscado y mezclar.



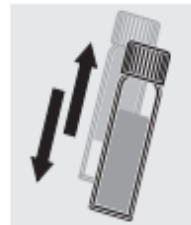
Verificar el valor pH de la muestra.
Rango nominal: pH 10,0-11,5.



Agregar 6 gotas de **K-1K**, cerrar la cubeta con el tapón roscado y mezclar.



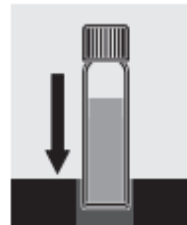
Agregar 1 cuchara micrométrica azul rasa de **K-2K** y cerrar la cubeta con el tapón roscado.



Sacudir enérgicamente la cubeta para diluir las sustancias sólidas.



Dejar en reposo durante 5 minutos exactamente. **A continuación, medir inmediatamente.**



Colocar la cubeta en el compartimiento del fotómetro e iniciar la medición.

Observaciones:

- La turbiedad de la solución de medición permanece estable sólo por breve tiempo (El valor de medición aumenta cada minuto en un 5 - 7 %.).
- Recomendamos, por cada paquete abierto de un juego de ensayos, determinar el nuevo valor en blanco de reactivos (agua desionizada, en lugar de la muestra).
- Vea más detalles en el papel informativo en el empaque del test.