

Efecto de la fuente nitrogenada sobre la capacidad de degradación del petróleo diesel 2 por *Pseudomonas sp.*

Nélida Milly Otiniano-García

Introducción

Gran parte del desarrollo creciente de la sociedad moderna y contemporánea se fundamenta en la explotación de petróleo, el aumento de la demanda de este hidrocarburo, implica un alto riesgo de derrames accidentales que pueden ser minimizados, mas no totalmente eliminados. La preocupación por el medio ambiente aumentó después de los grandes derrames que causaron graves daños en el ecosistema; en consecuencia, se desarrollaron técnicas que incluyen métodos físicos, químicos y biológicos para remediar áreas contaminadas por petróleo y sus derivados.

Entre los derivados del petróleo, el diesel 2 es el combustible que más se consume en el Perú y es utilizado principalmente en el transporte, la industria y la generación eléctrica. Su consumo se incrementó entre los años 1995 y 1999 debido al crecimiento de la generación termo eléctrica a base de este combustible y al aumento de la flota automotriz a Diesel como consecuencia de haberse aplicado menores impuestos que a las gasolinas. En el año 2004, la demanda interna de derivados de petróleo alcanzó un promedio de 151.6 Millones de Barriles De Petróleo (MBDP), siendo el diesel 2 el combustible que tuvo la mayor demanda con 63.7 MBDP (42%), seguido por las residuales y las gasolinas para los que se registraron consumos de 27,0 MBDP (18%) y 21.7 MBDP (14%) respectivamente.

El petróleo tiene el problema de ser insoluble en agua y, por lo tanto, difícil de limpiar. Además, su color, olor y viscosidad lo hacen difícil de disimular. En general, los derrames de hidrocarburos afectan profundamente a la fauna y vida en el lugar, razón por la cual la industria petrolera mundial debe cumplir con normas y procedimientos muy estrictos en materia de protección ambiental.

En el Perú se registran derrames de petróleo desde 1978, uno de ellos fue el producido en el oleoducto marino de Talara, hasta uno de los últimos ocurrido el año 2000 en el río Marañón que afectó la Reserva Pacaya-Samiria, que es el área protegida de mayor superficie del país. Este derrame de 5 500 barriles de petróleo, afectó los distritos de Urarinas y Parinari, provincia de Loreto, constituyendo un desastre ecológico, cuyas consecuencias están todavía perjudicando el ambiente y a la población nativa de la zona. La responsable tanto del accidente como de la actual situación fue la transnacional Pluspetrol, con sede en Argentina.

Se estima que el derrame ha afectado a unas 20.000 personas, muchas de las cuales pertenecen al grupo étnico Cocamas-Cocamillas. La contaminación de las aguas ha alterado su vida cotidiana, ya que ellos utilizan el agua del río para beber, bañarse y para espar-

cimiento. La pesca, que constituye su recurso básico, se ve impedida por la contaminación existente y la muerte de la fauna del río. Se han multiplicado los casos de diarrea y enfermedades de la piel. Pero no solo derrames mayores causan contaminación sino también los constantes derrames accidentales en suelos de nuestra selva, los que se producen por el rompimiento del Oleoducto Nor-Peruano, debido a accidentes naturales y por la actividad extractiva.

También se han registrado derrames accidentales como el que ocurrió en el río Pabelón La Quinoa a la altura del km 50 de la carretera Cajamarca-Hualgayoc, mientras se transportaba combustible para la minera Gold Fields, generando masiva intoxicación y muerte de miles de truchas y poniendo en peligro la ingesta tradicional de los habitantes de la zona.

El efecto de los combustibles (crudo, diesel, gasolina u otros) sobre las especies que habitan nuestro mar es diverso y la mayoría de las veces letal, algunos de ellos son: las aves pierden su capacidad de volar y sus plumajes pierden impermeabilidad; los peces que se impregnan pierden su habilidad natatoria, pero las principales afectadas son aquellas especies que, por su limitada capacidad de movilización quedan expuestas, y sin capacidad de respuesta, al hidrocarburo.

Desde hace varios años, se han estudiado diversos procedimientos con el fin de remediar sitios contaminados con hidrocarburos, donde una de las alternativas es la utilización de microorganismos como bacterias, hongos, levaduras o microalgas ya sea en cultivo axénico o en forma de consorcios. El término que se utiliza para definir este método es biorremediación, y es uno de los métodos más efectivos, menos costosos y con una menor alteración del ecosistema. La biorremediación se basa en tres aspectos principales: La existencia de microorganismos con capacidad catabólica para degradar un contaminante, la disponibilidad del contaminante para el ataque microbiano o enzimático, y las condiciones ambientales adecuadas para el crecimiento y actividad del agente.

La principal característica de la biorremediación, es que los contaminantes no se destruyen, sino que a través de la actividad microbiana se transforman en compuestos químicamente diferentes e inocuos para el ambiente. Cuando la transformación llega hasta la generación de dióxido de carbono y agua, se habla de una completa mineralización.

Se ha investigado durante varios años la capacidad degradativa de hidrocarburos por microorganismos, se ha informado que existe un amplio número de géneros bacterianos, entre los cuales podemos destacar a *Brevibacterium*, *Spirillum*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Bacillus*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas aureofasciens*, *Pseudomonas sp*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Cándida*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*, los cuales disminuyen la concentración de hidrocarburos presentes en el ambiente y al mismo tiempo son inocuas para la salud y el medio ambiente⁽¹⁶⁾. Estas bacterias producen bioemulsificantes y biosurfactantes que disminuyen la tensión superficial entre el petróleo y el medio acuoso facilitando el acceso microbiano a la fuente de carbono insoluble para su degradación.

Para que los microorganismos puedan llevar a cabo la biodegradación de los hidrocarburos en el suelo, la humedad, aireación, pH, y temperatura, entre otros, deben encontrarse dentro de rangos óptimos para tal fin, ocurriendo lo mismo para los diferentes nutrientes,

donde se ha podido observar que los nutrientes limitantes para que este proceso ocurra son el nitrógeno y el fósforo. En los sistemas diseñados la relación final de carbono/nitrógeno/fósforo (C:N:P) fue de 100:5:1.

La determinación de la fuente de nitrógeno es esencial para el proceso de biorremediación, pues el nitrógeno está íntimamente ligado al metabolismo de los microorganismos. Como lo demostraron algunos estudios realizados en hongos en los que por cada 100 unidades de carbono degradadas fueron necesarias 3 a 4 unidades de nitrógeno. De las diversas formas de nitrógeno encontradas en la naturaleza, los microorganismos asimilan más fácilmente el amonio, sin embargo, los microorganismos que poseen enzimas nitrato y nitrito reductasas presentan la capacidad de asimilar respectivamente nitrato o nitrito, reduciéndolos a nitrito y amonio respectivamente.

Al intentar emplear microorganismos en el control de la contaminación, se deben reconocer dos principios interrelacionados. El primero es que los microorganismos activos metabólicamente catalizan reacciones de eliminación de contaminantes, que dependen de la concentración del catalizador o de la biomasa activa. El segundo es que la biomasa activa crece y se sustenta utilizando los sustratos primarios generadores de electrones y energía, que son sus donantes y aceptores de electrones. La producción de biomasa activa es proporcional a la utilización de sustratos primarios. La conexión entre la biomasa activa (el catalizador) y los sustratos primarios es el factor fundamental para comprender y explotar los sistemas microbianos para el control de contaminación.

A nivel mundial se están realizando muchos estudios sobre biodegradación de petróleo diesel. La Agencia Americana de Protección del Ambiente (EPA), está dando énfasis a las investigaciones sobre la degradación de petróleo diesel, que por ser un producto de la refinación del crudo, tiene composición más simple y el contenido de azufre es menor, lo que facilita el seguimiento de la degradación. Estudios de biorremediación *in situ* de suelos contaminados con diesel, han obtenido un éxito rotundo en la degradación de compuestos totales de petróleo.

Uno de los casos mejor estudiados, es la biodesulfuración oxidativa del petróleo diesel por *Rhodococcus sp*, se ha demostrado que este microorganismo es capaz de reducir más de la mitad del contenido de azufre en diesel, por lo que se considera como una importante alternativa a la hidrosulfuración catalítica.

También se está ensayando la utilización de enzimas que no requieren de la regeneración de cofactores como base de los catalizadores, y se ha demostrado que la enzima cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* puede oxidar selectivamente el azufre de los organoazufrados del diesel, los cuales pueden ser removidos eficientemente de la mezcla mediante una destilación convencional.

En 1981, Atlas y Bartra desarrollaron un abono nitrogenado y fosforado oleófilo que sitúa el nitrógeno y fósforo en la interface petróleo-agua, donde tiene lugar la biodegradación activa. Al ser oleófilo, el abono no se diluye y permanece unido al petróleo, allí donde es necesario. Tras el vertido del *Amoco Cadiz* frente a las costas francesas en 1978, la empresa Elf Aquitaine desarrolló un abono oleófilo comercial llamado Inipo EAP 22, que es una microemulsión con urea como fuente de nitrógeno, lauril fosfato como fuente de fósforo y ácido oleico como fuente de carbono para reforzar las poblaciones de microorganismos de-

gradadores de hidrocarburos que dio muy buenos resultados en el tratamiento del vertido del *Exon Valdez* frente a las costas de Alaska en 1989.

En el Perú, no faltan los daños ambientales causados por hidrocarburos, como los ocasionados por tomas clandestinas, perforaciones, fugas, y vertimiento al suelo de aceites provenientes de transportes e industrias que generan complejas combinaciones químicas, así mismo se observa con frecuencia que en algunos puertos marítimos como Salaverry, en el departamento de la Libertad, el mar recibe descargas continuas de petróleo diesel de las embarcaciones, lo que causa un grave daño no solamente a la flora acuática, sino también a las aves del lugar y a los bañistas ya que los hidrocarburos tienen propiedades mutagénicas, tóxicas y cancerígenas.

En Trujillo se han realizado estudios sobre aislamiento e identificación de microorganismos degradadores de petróleo, y se ha estudiado el efecto del inóculo y sustrato en la degradación del petróleo en agua de mar artificial con cultivo bacteriano mixto. En trabajos previos, se investigó la eficiencia de degradación de petróleo diesel por el consorcio Microorganismos Eficaces (EM) en biorreactores de tanque aireado y agitado, y también en biorreactores con biopelículas, encontrando en ambos casos más del 50% de eficiencia. También se están realizando trabajos para determinar el efecto de la concentración de petróleo diesel 2 en la cinética de crecimiento de *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Micrococcus* y *Lactobacillus*, con miras a obtener cepas cuya velocidad de crecimiento no se vea afectada por el petróleo.

Son pocos los estudios realizados acerca de la influencia de la fuente nitrogenada sobre la capacidad de biorremediación de petróleo por bacterias, sin embargo, Caldas y Solórzano, al ensayar las condiciones de degradación de hidrocarburos por hongos filamentosos *Aspergillus niger* y *Penicillium corylophilum*, empleando como fuentes de nitrógeno urea, nitrato de sodio y sulfato de amonio, determinaron que utilizando la urea se obtuvo el mayor porcentaje de degradación (17.7%) para *Aspergillus niger* y 20.1% para *Penicillium corylophilum*, en ambos casos se logró mayor eficiencia que con el empleo de Extracto de levadura en el medio control (13.1%). Este estudio nos brinda un dato muy importante puesto que la urea es un insumo de bajo costo que permitiría establecer procesos de biorremediación mucho más económicos, sin embargo aún falta determinar si la urea tendrá el mismo efecto sobre cultivos bacterianos, como *Pseudomonas sp.*

La finalidad del presente estudio fue evaluar el efecto de la fuente nitrogenada sobre la capacidad de degradación de diesel 2 por *Pseudomonas sp* con miras a obtener una fuente de nitrógeno óptima para que estas bacterias desarrollen su máximo potencial de degradación de petróleo diesel 2, y a la vez permitan establecer procesos de biorremediación menos costosos.

Material y métodos

Material de estudio

Cultivo de *Pseudomonas sp*, aislado de lodos activos de la planta de tratamiento de aguas Covicorti-Trujillo.

Medios de cultivo

- Agar Plate Count
- Agar Soya Tripticasa
- Medio Mínimo de Davies
- Urea
- Nitrato de Sodio
- Sulfato de amonio
- Extracto de levadura

Preparación de los inóculo

El cultivo fue inoculado en placas con Agar Soya Tripticasa e incubado a temperatura ambiental $22 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 24 horas.

Transcurrido ese tiempo, se cosecharon las células con S.S.F estéril, preparando suspensiones similares al tubo N° 3 del Nefelómetro de Mac Farland.

Preparación de los sistemas de evaluación

Una vez armados y debidamente esterilizados, los cuatro biorreactores se alimentaron de la siguiente manera:

0.98 Litros de medio mínimo de Davies, con petróleo diesel 2 al 5% como fuente de carbono, y como fuente de nitrógeno Urea, Nitrato de sodio, o Sulfato de amonio según correspondía y al biorreactor control se le agregó extracto de levadura, en todos los caso la relación C/N fue de 100/10 luego, a cada biorreactor se adicionó 20 ml de inóculo de *Pseudomonas sp.* Cada experimento se realizó por triplicado.

Determinación de la mineralización del petróleo diesel 2

Se midió la concentración de petróleo diesel 2 midiendo la concentración de grasas totales por el método de Gerber, al inicio y al final del proceso (a los 45 días de tratamiento).

Determinación de la cinética de crecimiento

Al tiempo cero y cada 48 horas se tomaron muestras de cada uno de los biorreactores y se hicieron diluciones para llevar a cabo el recuento de microorganismos por el método de recuento en placa en Agar Plate Count.

Luego los datos fueron ploteados en papel semilogarítmico, y corregidos por el método de los mínimos cuadrados para hallar la velocidad de crecimiento de los microorganismos en estudio.

Determinación de la eficiencia del bioproceso

La eficiencia se evaluó de acuerdo al tiempo de residencia del hidrocarburo en el biorreactor y al consumo del mismo durante el tratamiento.

$$\% \text{ eficiencia} = \frac{MO_c}{MO_i} \times 100$$

$$MO_c = MO_i - MO_f$$

Donde:

MOc = materia orgánica consumida (% de petróleo v/v)

MOi = concentración inicial de materia orgánica (% de petróleo v/v)

MOf = concentración final de materia orgánica (% de petróleo v/v)

Análisis de datos

Se aplicó la prueba t de Student ($p = 0.05$) para comparación de promedios y obtención de la diferencia significativa entre los resultados obtenidos empleando las diferentes fuentes nitrogenadas, con respecto a los resultados obtenidos con extracto de levadura, para esto se empleó el paquete de cómputo SPSS 15.0 para Windows.

Resultados

Al evaluar el efecto de la fuente nitrogenada sobre la capacidad de mineralización de petróleo Diesel 2 por *Pseudomonas sp.*, se encontró que el mayor porcentaje de eficiencia se alcanza cuando se emplea sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (92.67%), seguido por el valor obtenido cuando se emplea urea (70.66%), no se observó diferencia significativa ($p = 0.05$) cuando se comparó el porcentaje obtenido en el biorreactor con nitrato de sodio, con el obtenido cuando se empleó el extracto de levadura que sirvió como control como se puede observar en la tabla 1.

En la tabla 1 también se puede observar que la mayor velocidad de crecimiento de *Pseudomonas sp.*, se alcanza cuando desarrolla en presencia de sulfato de amonio (2.07 día⁻¹), no existiendo diferencia significativa con la velocidad alcanzada cuando se emplea extracto de levadura (2.13 día⁻¹), la menor velocidad de crecimiento se obtuvo cuando se empleó urea como fuente nitrogenada (0.64 día⁻¹), lo cual se ve reflejado en las pendientes de la curva de crecimiento que se presentan en la figura 1.

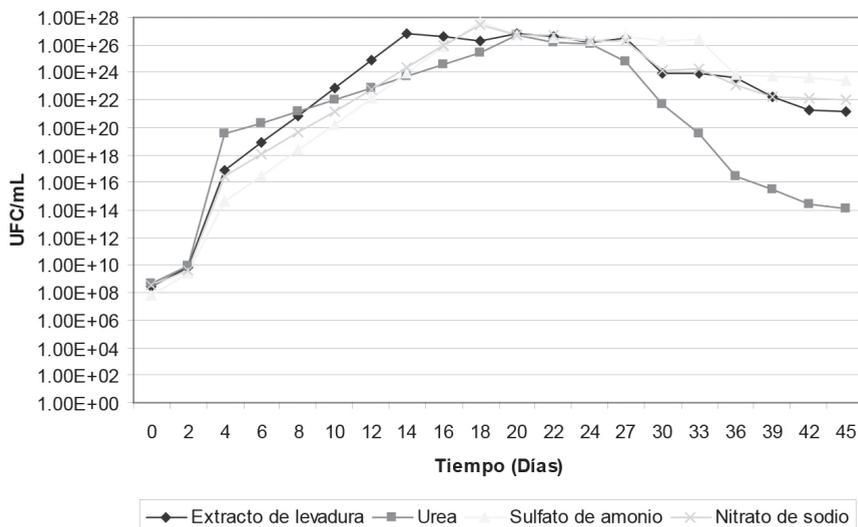
Tabla 1

Valores promedio del porcentaje de eficiencia en la degradación de petróleo diesel 2 y la velocidad de crecimiento de *Pseudomonas sp.*, cultivado en biorreactores de tanque agitado empleando cuatro fuentes nitrogenadas

Fuente de nitrógeno	% de eficiencia	Velocidad de crecimiento (Día ⁻¹)
Extracto de levadura (control)	56.47	2.13
Sulfato de amonio	87.40 ($p = 0.5798$)	2.07 ($p = 0.5708$)
Urea	33.66 ($p = 0.032$)	0.69 ($p = 0.032$)
Nitrato de sodio	54.25 ($p = 0.0017$)	1.11 ($p = 0.0017$)

$P = 0.05$

Figura 1
 Curva de crecimiento de *Pseudomonas sp.*, en biorreactores de tanque agitado empleando extracto de levadura (control), urea, sulfato de amonio y nitrato de sodio como fuentes nitrogenadas durante la degradación de petróleo diesel 2



Discusión

Cuando se van a llevar a cabo procesos de biodegradación de petróleo, es preciso tener en cuenta que el petróleo es una mezcla muy compleja de distintos compuestos químicos, gran parte de ellos pueden ser metabolizados y convertidos en CO_2 y H_2O . Sin embargo, existen varios factores que dificultan el proceso de biodegradación. El principal es que el petróleo contiene mucho carbono y bastante azufre en formas asimilables por los microorganismos, pero tiene muy poco nitrógeno y fósforo. Como todos los seres vivos, los microorganismos necesitan un aporte equilibrado de diferentes nutrientes. Por lo tanto, los hidrocarburos del petróleo no podrán ser metabolizados eficientemente por los microorganismos a menos que se suministren fuentes de nitrógeno y fósforo adecuadas.

La determinación de la fuente de nitrógeno es esencial para el proceso de biorremediación, pues el nitrógeno está íntimamente ligado al metabolismo de los microorganismos, ya que proporciona el elemento necesario para la producción de aminoácidos y enzimas, como mencionan Ercoli al llevar a cabo el análisis y evaluación de los parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo, y debido a que la utilización de estos compuestos es muy rápida los suelos no alcanzan a cubrir todas las necesidades del proceso, por lo que deben ser incorporados bajo la forma de fertilizantes de uso agrícola como urea o sulfato de amonio.

En este trabajo, a fin de evaluar el efecto de la fuente nitrogenada sobre la mineralización de diesel 2 por *Pseudomonas sp.*, se emplearon dos fuentes nitrogenadas inorgánicas (sulfato de amonio y nitrato de sodio) y dos fuentes orgánicas como el extracto de levadura

(control) y la urea, durante 45 días de monitoreo; se empleó el extracto de levadura como control, puesto que es el ingrediente que se emplea en los medios de cultivo convencionales, como se sabe el extracto de levadura estimula el crecimiento por ser una buena fuente de aminoácidos, vitaminas, y otros nutrientes; por esta razón como se puede observar en la tabla 1, aunque el porcentaje de eficiencia en la degradación de petróleo diesel 2 no es el más alto cuando se emplea esta fuente de nitrógeno (56.47%), se obtiene la mayor velocidad de crecimiento (2.13 día^{-1}), lo que indicaría que por ser un sustrato complejo, aporta además alguna fuente carbonada que impide que el microorganismo se incline exclusivamente hacia el metabolismo del petróleo, como ocurre cuando se emplean otras fuentes más simples; sin embargo si se tiene en cuenta la viabilidad económica del proceso, el costo elevado de este nutriente afectaría considerablemente la economía, de modo que se hace indispensable procurar otras fuentes de N que disminuyan los costos de producción, siendo las más recomendables las fuentes inorgánicas, que además de ser más baratas son muy utilizadas en procesos industriales.

El análisis de resultados revela que la mayor eficiencia de degradación fue obtenida con la adición de sulfato de amonio (87.40%) ($p < 0.05$), además se obtuvo la mayor velocidad de crecimiento después del extracto de levadura, esto podría explicarse teniendo en cuenta que de las diversas formas de nitrógeno encontradas en la naturaleza, los microorganismos asimilan más fácilmente el amonio, el cual por carecer de componentes carbonados, obliga al microorganismo a utilizar el petróleo como única fuente de carbono, lo que se comprueba al determinar la curva de crecimiento, pues la determinación de la biomasa microbiana es una herramienta que ha sido utilizada, fundamentalmente, para evaluar la respuesta *in situ* de las bacterias del suelo, a la hora de degradar contaminaciones por hidrocarburos derivados del petróleo. La respuesta de la comunidad microbiana, reflejada en forma de un incremento significativo en la densidad de población, es un indicador del potencial intrínseco de la descontaminación biológica y por extensión de la posibilidad de estimular ese potencial, y en este caso también se obtuvo una velocidad de crecimiento muy similar a la obtenida con extracto de levadura (2.07 día^{-1}).

Cuando se empleó nitrato de sodio como fuente nitrogenada, se obtuvo un porcentaje de eficiencia muy similar al encontrado empleando extracto de levadura ($p = 0.399$), esto debido a que *Pseudomonas*, posee enzimas nitrato y nitrito reductasas que le otorgan la capacidad de asimilar respectivamente nitrato o nitrito, reduciéndolos a nitrito y amonio respectivamente.

A diferencia de Caldas y Solórzano⁽²⁵⁾ quienes al emplear hongos en tratamientos de suelos contaminados con hidrocarburos, obtuvieron el mayor porcentaje de mineralización empleando urea como fuente de nitrógeno, en este trabajo, se obtuvo el porcentaje de eficiencia más bajo cuando se empleó urea como fuente nitrogenada (33.66%), lo que se relaciona con la ineficiencia en la producción de enzima ureasa por las bacterias del género *Pseudomonas*, lo cual también se ve reflejado en la velocidad de crecimiento (0.69 día^{-1}) que resultó ser la más baja de todas como se puede observar en la tabla 1.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, no están muy alejados de los obtenidos en otras investigaciones, así Barraza, refiere que la biodegradación de petróleo crudo y gasolina en sistemas terrestres y marinos se acelera por adición de nitrógeno y fósforo

en forma de urea, fosfato y sales de amonio, lo cual fue demostrado por los investigadores de la Empresa Elf Aquitaine al emplear Inipo EAP 22 (compuesto de urea, laurilfosfato y ácido oleico) en la limpieza del vertido del buque Exxon Valdez, frente a la costas de Alaska en 1989, logrando incrementar las poblaciones de microorganismos degradadores de hidrocarburos. Esto se explica porque cuando hay un vertido de petróleo en ambientes que presentan una baja concentración de nutrientes inorgánicos, se suelen producir elevados cocientes de C:N y/o C:P los cuales son desfavorables para el crecimiento microbiano. Como se sabe, la disponibilidad de N y P limita la degradación microbiana de hidrocarburos. De esta manera, el ajuste de estas proporciones mediante la adición de nutrientes en forma de fertilizantes oleofílicos incluyendo urea parafinizada, octoato férrico, $MgNH_4PO_4$ en soporte de parafina y óxido 2-etilhexildipoliétileno fosfato estimularán la biodegradación.

La EPA recomienda utilizar proporciones C:N de 100:10 a 1000:10 para la biodegradación de suelos contaminados por hidrocarburos. Aunque en general la adición de fuentes inorgánicas de N y P al suelo es beneficiosa para los procesos de biodegradación, existen estudios que han descrito efectos inhibitorios en la adición de nutrientes inorgánicos. Morgan y Watkinson describieron una inhibición de la mineralización de fenantreno al añadir nitrógeno inorgánico.

Asimismo, el uso excesivo de nutrientes inorgánicos también puede inhibir los procesos de biodegradación. Para evitar el exceso de nutrientes, así como la pérdida de los mismos por lixiviación, también se han utilizado fertilizantes inorgánicos oleofílicos de liberación lenta (Inipol EPA 22) para la biorremediación de suelos contaminados.

Además es importante destacar que cuando se trata de suelos contaminados con hidrocarburos, la acción de los nutrientes inorgánicos puede estar limitada debido a la interacción química con los minerales del suelo (el amonio se puede unir a las arcillas por intercambio catiónico y el fosfato puede calcio, hierro y aluminio), de allí la importancia de realizar estudios de laboratorio para determinar el efecto que causará un nutriente determinado.

Como se puede observar en los resultados, la biomasa aumentó en función a la capacidad de *Pseudomonas* para metabolizar las diferentes fuentes nitrogenadas mostrando una cinética de crecimiento típica de Monod, lo que indica que el hidrocarburo ha sido usado para el crecimiento bacteriano, y a pesar de que se obtuvieron porcentajes de eficiencia bastante aceptables, en ninguno de los casos se logró una completa degradación del petróleo hasta CO_2 .

El hecho de no alcanzar la completa degradación puede deberse a la complejidad en la composición del diesel 2, pues está compuesto mayormente de alcanos lineales o ramificados con cadenas de diferente longitud y contiene una variedad de compuestos aromáticos, muchos de los cuales son conocidos por ser fácilmente biodegradables, sin embargo, debido a su baja solubilidad en agua, la biodegradación de estos compuestos casi siempre está limitada por las bajas tasas de disolución, sorción o transporte. En general, la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos, está determinada por sus características de sorción, y disolución y procesos de transporte a través de la célula microbiana, en este caso, la biodegradación no parece estar limitada por las características metabólicas de *Pseudomonas* ya que se degradó una fracción importante de este hidrocarburo, sin embargo la incapacidad de las bacterias de degradar totalmente el hidrocarburo parece deberse a

limitaciones en transferencia de masa, por lo cual el hidrocarburo no se degrada totalmente, y hace necesario continuar con los estudios para lograr la optimización de este bioproceso.

Conclusiones

El sulfato de amonio tiene efecto favorable sobre la degradación de petróleo diesel 2 por *Pseudomonas sp.*, aumentando la eficiencia del bioproceso ($p = 0.0002$).

La urea ejerce efecto desfavorable sobre la degradación de diesel 2, disminuyendo la eficiencia del bioproceso ($p = 0.0039$).

No hay diferencia significativa entre los porcentajes de eficiencia en la degradación de diesel 2 cuando se emplean extracto de levadura y nitrato de sodio como fuentes nitrogenadas ($p = 0.399$), por lo que ejercen el mismo efecto sobre la degradación de diesel 2, logrando un porcentaje de eficiencia de alrededor del 55%.

Recomendaciones

Evaluar otros factores que pueden afectar la eficiencia de la biodegradación de diesel 2, como los valores de pH y temperatura. Evaluar otras fuentes de nitrógeno y de fósforo para mejorar el proceso de biodegradación.

Referencias

- Atlas, R.
1981 "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective". *Microbiol Rev.* 45: 180-209.
- Atlas, R. y Bartha, R.
1977 "The microbiology of aquatic oil spills". *Adv. Appl. Microbiol.*, 22: 225-266.
- Anderson, R.T., y D.R. Lovely
2000 "Hexadecane decay by methano-genesis". *Nature.* 404:722-723.
- Antunes, J.
1997 "Bioconversão de D-xilose a etanol por *Pichia stipitis*". Tese de Maestrado. Escola de Química-UFRJ, Rio de Janeiro.
- Aeckersberg, F., F. Rainey, y F. Widdel
1998 "Growth, natural relationships, cellular fatty acids y metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions". *Arch. Microbiol.* 170: 361-369.
- Bull, A.
2000 *Later Microbial interactions y communities*. Vol. 1: 18-19.
- Crawford, S., Jhonson, G. y Goetz, F.
1993 "The potential for biorremediation of soils containing PHAs by composting". *Compost Science y Utilization*, 1(3): 41-47.
- Calvin, H.; R. Loehr; E. Nyer; M. Pitrowski; M. Thomas; J. Spain; J. Wilson; R. Norris.
1995 "Innovate Site Remediation Technology". *Biorremediation*. Ed. William Anderson. American Academy of Environmental Engineers.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J.
1998 *Biología de los microorganismos*. España: Prentice Hall.

- Moreira, F y J. Siqueira
2002 *Microbiología e bioquímica do solo*. UFLA.
- Ramorino, S.
1989 "Diagnóstico sobre la contaminación por hidrocarburos de petróleo en el pacífico sudeste: Colombia, Chile, Ecuador, Panamá y Perú". Valparaíso: CPPS, PNUMA, COI.
- Mujica, H.
2006 "Grave contaminación ecológica en el norte del Perú". Voltaire net.org. Red de Prensa no Alineados. <http://www.voltairenet.org/article141850.html>
- Dibble, J. y Bartha R.
1979 "Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge". *Cook College, Rutgers-The State University of New Jersey*, 37 (4): 729-739.
- Korda, A., Santas, P., Tenente, A. y Santas, R.
1997 "Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling y analytical techniques, *in situ* treatments y commercial microorganisms currently used". *Appl Microbiol Biotechnol*. 48: 677-686.
- Swannell, R., Lee, K. y McDonagh, M.
1996 "Field evaluations of marine oil spill bioremediation". *Microbiol Rev*. 60: 342-365.
- Pandey, A., Soccol, C. y Mitchell, D.
2000 "New development in solid state fermentation: I. bioprocesses y products". *Process Biochem*. Vol. 35: 1153-1169.
- Senior, E. y Balba
1990 "Refuse descomposition". Senior, E., *Microbiology of landfill sites*. CRC Press, Boca Raton, FL. 18-57.
- Jin, G. y A. Englande
1998 "Carbon tetrachloride biodegradation in fixed biofilm reactor y its kinetic study". *Science y Technology*, 38 (8): 155-162.
- Schindler, I y A. Friedl
1998 "Degradation of toluene/heptane mixtures in a trickling-bed bioreactor". *Applied Microbiol. Biotechnol*. 44: 230-233.
- Pucci, O. H., Back, M. A., Peressutti, S. R., Klein, I., Hartig, C., Álvarez, H. M. y Wunsche, L.
2000 "Influence of crude oil contamination on the bacterial community of semiarid soils of Patagonia (Argentina)". *Acta Biotechnol*, 30: 129-146.
- Leahy, J. y Colwell, R.
1990 "Microbial degradation of hydrocarbons in the environment". *Microbiological Reviews*, 3 (54): 305-315.
- Sneath, P y Sokal, R.
1973 *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman y Company, San Francisco.
- Putzke, J. y Putzke, M. T. L.
2002 *Reino dos Fungos*. EDUNISC. Vol. 2: 630-632
- Rittman, B. y MacCarty, P.
2001 *Biotecnología del medio ambiente. Principios y aplicaciones*. España: McGraw-Hill.
- Sheenan, J.; V. Cambreco; J. Duffield; M. Graboski; H. Spoure.
1998 "An Overview of Biodiesel y Petroleum Diesel Life Cycles". *National Renewable Energy Laboratory*. Colorado. USA.
- Ossio, E. A.
1979 "Análisis ambiental de la explotación de petróleo en la Amazonia peruana". V Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Lima, Perú. 12-16 noviembre.

- Cabeza, R.
1981 "Aislamiento y recuento de levaduras que degradan petróleo en suelos de oleocentros del distrito de Trujillo". Tesis de la Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
- Reinteria, A.
1997 "Aislamiento y selección primaria de cultivos bacterianos capaces de utilizar petróleo como única fuente de carbono". Tesis de la Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
- Okabe, S.; H. Kuroda; Y. Watanabe. S
1998 "Significance of biofilm structure on transport of inert particulates into biofilms". *IAWQ. Sci. Tech.* Vol. 38 (8-9): 163-170.
- Otiniano-García, M.
2002 "Eficiencia de los microorganismos eficaces en la biorremediación de agua de mar contaminada con petróleo diesel en biorreactor aireado y agitado". Trabajo de Habilitación para postular a la docencia de la Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
2003 "Eficiencia de un biorreactor con película de 'Microorganismos Eficaces' en la biorremediación de agua de mar contaminada con petróleo diesel". Tesis de la Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
- Sirlopú, C; P. Rojas
1997 "Efecto de la concentración de inóculo y sustrato en la degradación de petróleo en agua de mar artificial con un cultivo mixto bacteriano". Tesis de la Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
- Caldas, L; J. Solorzano
2004 *Degradação de hidrocarbonetos por Aspergillus niger e Penicillium coryophilum*. Inic. Científica. Química. UFRJ.
- Food and Drug Administration (FDA)
1995 "Bacteriological Analytical manual". FDA: United States.
- Chapelle, F
1993 *Ground water Microbiology and Geochemistry*. Wiley, New York: 264-329.
- Ercoli, E., J. Gálvez; M. Di Paola; J. Cantero; S. Videla; M. Medaura; J. Bauzá
2001 "Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo". Laboratorio de bioprocesos. Facultad de Ingeniería. Universidad de Cuyo. Mendoza.
- Martín, C; A. González; Blanco, M.
2004 "Tratamientos biológicos de suelos contaminados: Contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorecuperación". *Rev. Iberoam Micol*; 21: 103-120.
- Soberón, G.
2002 "*Pseudomonas aeruginosa*. Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de México". Dra. Esperanza Martínez Romero y Julio César (eds.).
- Nester, E; D. Anderson; E. Roberts; N. Pearsall; M. Nester
2004 *Microbiology. A Human Perspective*. New York: McGraw-Hill..
- Barraza, R.
2005 "Degradación de biodiesel y diversidad bacteriana en suelos arenosos de una zona industrial (Guaynila, Puerto Rico)". Tesis de la Universidad de Puerto Rico.
- Fernández, A.
2006 "Biorremediación: Descontaminación natural". *Rev. Ecología*. 25/09. <http://www.webislam.com/?idt=5806>
- Margesin, R.; F. Schinner
2000 "Bioremediation (Natural attenuation y Biostimulation) of diesel oil contaminated soil in an alpine glacier skiing area. Institute of Microbiology". University of Innsbruck, Austria.

Environmental protection Agency (EPA)

- 1996 "Ecological Effects Test Guidelines". OPPTS 850.4225 Seedling Emergence, Tier II. EPA 712-C-96-363.

Morgan, P y R. Watkinson

- 1992 "Factors limiting the supply y efficiency of nutrient y oxygen supplements for the in situ biotreatment of contaminated soil y groundwater". *Water Res.* 26: 73-78.

Genouw, G; F De Naeyer; P Van Meenen; H. Van de Werf, W, De Nijs y W. Verstraete

- 1994 Degradation of oil sludge by landfarming-a case study at the Ghent harbor. *Biodegradation.* 5:37-46.

Zhou, E. y R. L. Crawford

- 1995 "Effects of oxygen, nitrogen, y temperature on gasoline biodegradation in soil". *Biodegradation*, **6**:127-140.

Margesin, R. y F Schinner

- 1997 "Laboratory bioremediation experiments with soil from a diesel-oil contaminated site: significant role of cold adapted microorganisms y fertilizers". *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 70: 92-98.

Lindstrom, J, R. Prince, J. Clark, M. Grossmann y T. Yeager.

- 1991 "Microbial populations y hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill". *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2514-2522.

Pritchard, P Costa

- 1991 "EPA's Alaska oil spill bioremediation Project". *Environ. Sci. Technol.* 25: 372-379.

Márquez-Rocha, F; V. Hernández-Rodríguez y M. Lamela

- 2001 "Biodegradation Of Diesel Oil In Soil By A Microbial Consortium". *Water, Air y Soil Pollution*, 128: 313-320.

Anexo

Figura 2
Biorreactores de tanque agitado al inicio del proceso de degradación de petróleo diesel 2 por *Pseudomonas* sp, empleando urea, nitrato de sodio, sulfato de amonio y extracto de levadura como fuentes nitrogenadas



Figura 3
Biorreactores de tanque agitado, al final el proceso de degradación de petróleo diesel 2 por *Pseudomonas* sp, empleando urea, nitrato de sodio, sulfato de amonio y extracto de levadura como fuentes nitrogenadas

