Análisis de la capacidad degradativa de diésel efectuada por microorganismos acidófilos y su aplicación individual y en consorcio en un sistema de biorremediación

Analysis of diesel degradative capacity by acidophilic microorganisms and its application as individual and consortium bioremediation system

Marián Alicia Hermoza Gutiérrez^a, Oscar Christian Medina Carpio^a, Pamela Lizeth Manrique Pino^a, Haruna Luz Barazorda Ccahuana^a, Jonathan Joseph Almirón Baca^b

^aEscuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, Universidad Católica de Santa María. Arequipa Perú.

^bEscuela Profesional de Ingeniería Mecánica, Mecánica Eléctrica y Mecatrónica, Facultad de Ciencias e Ingenierías Físicas y Formales, Universidad Católica de Santa María. Arequipa Perú.

INFORMACIÓN

Historia del Artículo

Recepción: 15/06/2019

Revisión: 14/07/2019

Aceptación: 30/08/2019

Palabras Clave

Biodegradación, hidrocarburos, diésel, consorcio nativo, *Kocurea Rosea* y *Burkholderia pseudomallei*.

Key Words

Biodegradation, hydrocarbons, diesel, native consortium, *Kocurea Rosea* and *Burkholderia pseudomallei*.

DOI

<https://doi.org/10.35286/veritas.v20i2.242>

RESUMEN

La presencia de hidrocarburos en suelos y aguas representa un serio problema de contaminación ambiental a nivel global ocasionado en su mayoría por derrames accidentales de productos derivados del petróleo como el diésel. Frente a esto la biorremediación natural surge como una alternativa amigable con el medio ambiente donde las comunidades nativas de microorganismos presentes en un cuerpo afectado por polución cooperan metabólicamente entre sí para subsistir, ya que han desarrollado mecanismos de adaptación a ambientes adversos usando como sustrato al propio agente contaminante. Actualmente los sistemas de biorremediación requieren de tiempos largos para llegar a obtener resultados eficientes de degradación; es por esto que, en la presente investigación se usan microorganismos provenientes de un suelo contaminado con diésel, para lo cual se realizó la caracterización fisicoquímica del suelo contaminado. Seguidamente, dos cepas fueron aisladas e identificadas molecularmente determinando que la cepa CR corresponde a *Kocurea Rosea* y la cepa CB a *Burkholderia pseudomallei*, las cuales crecieron en medio enriquecido con glucosa y diésel como sustratos. Se evaluaron los parámetros indicadores de degradación de hidrocarburos: concentración microbiana, concentración de hidrocarburos, concentración de glucosa y variación de pH en reactores provistos con medio mineral líquido enriquecido, cuyo pH inicial fue de 5. Las cepas aisladas lograron porcentajes de degradación de 51.27% (*Kocurea Rosea*) y 32.84% (*Burkholderia pseudomallei*) de diésel, mientras que el consorcio nativo mixto degradó el 48.78% del diésel presente en el medio durante 13 días de tiempo de residencia.

ABSTRACT

The presence of hydrocarbons in soils and waters represents a serious problem of global environmental pollution, often caused by accidental spills of petroleum products such as diesel. Natural bioremediation is shown as an environmentally friendly alternative. The native communities of microorganisms present in a body affected by pollution, metabolically cooperate with each other to survive; these have developed mechanisms of adaptation to adverse environments using the contaminating agent itself as a substrate. Currently, bioremediation systems require long times to obtain efficient degradation results; that is why, in the present investigation, microorganisms from a soil with the presence of diesel have been isolated from spills, for which the physicochemical characterization of contaminated soil was carried out. Next, two strains were isolated and molecularly identified, determining that the CR strain belongs to *Kocurea Rosea* and the CB strain to the *Burkholderia pseudomallei*, which grew in medium enriched with glucose and diesel as substrates. The hydrocarbon degradation indicator parameters were evaluated: microbial concentration, hydrocarbon concentration, glucose concentration and pH variation in reactors provided with enriched liquid mineral medium whose initial pH was 5. The isolated strains achieved degradation percentages of 51.27% (*Kocurea Rosea*) and 32.84% (*Burkholderia pseudomallei*) of diesel, while the mixed native consortium degraded 48.78% of the diesel present in the medium during 13 days of residence time.

Correspondencia:
Oscar Christian Medina Carpio
omedinacarpio@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental ocasionada por hidrocarburos de petróleo es un problema ambiental global. Uno de estos contaminantes es el diésel, el cual produce alteraciones tóxicas en muchos organismos y en humanos. La biorremediación de contaminantes es una técnica que utiliza la capacidad del microorganismo para degradar estas sustancias ocasionando la atenuación natural del contaminante, que puede mejorarse con técnicas de ingeniería, como la adición de microorganismos seleccionados o la bioestimulación. Es así que, se han realizado numerosos estudios sobre la degradación de contaminantes ambientales mediante el uso de bacterias, existiendo bacterias degradadoras de hidrocarburos denominadas hidrocarbonoclastas como *Pseudomona putida* y *Bacillus subtilis*, las cuales son extremófilas ya que pueden crecer en ambientes extremos como son los entornos contaminados con hidrocarburos debido a que pueden presentar temperaturas bajas o elevadas, pH ácido o alcalino, altas concentraciones de sal o alta presión. La biodegradación de muchos componentes de los hidrocarburos del petróleo ha sido reportada en una variedad de ecosistemas marinos y terrestres fríos. El conocimiento del potencial de biodegradación de los microorganismos acidófilos, alcalófilos o barófilos es limitado.

El objetivo de este estudio es obtener una comunidad microbiana nativa de un suelo contaminado con diésel, seguidamente aislar y caracterizar microorganismos específicos capaces de degradar hidrocarburos y finalmente evaluar la capacidad degradativa de diesel tanto del consorcio obtenido por aislamiento general como de las cepas individuales en un sistema de biorremediación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colección de muestra y obtención de consorcio nativo en medio líquido

Se tomaron muestras de suelo de una estación surtidora de combustible perteneciente a una empresa de buses del distrito de Cerro Colorado (Arequipa). Se retiraron restos de vegetación, piedras y agregados mayores pasando la muestra por un tamiz de 2 mm y se determinaron las principales características del suelo: pH, nitrógeno, materia orgánica, fósforo total, lubricantes, combustibles y conductividad eléctrica. Seguidamente, 1 g de la muestra fue colocado en un matraz con 100 ml de caldo tripteína de soya e incubada a 32°C por 18 h. Finalizado el tiempo de incubación, se trasvasó 1 ml del inóculo inicial en otro matraz con 100 ml de caldo tripteína de soya a 25 °C y a 150 rpm en un agitador orbital de marca GEHAKA A0-370 por 48 h, tiempo en el que el consorcio alcanzó la fase exponencial de crecimiento. Seguidamente se determinó la población microbiana presente en el medio líquido mediante recuento en cámara de Neubauer (BOECO BOE 01); asimismo, se hicieron diluciones seriadas a partir del cultivo líquido hasta una concentración de 10-5 para determinar la concentración de microorganismos viables presentes, evaluados mediante recuento en placa y expresados en UFC/g de suelo.

Aislamiento de microorganismos degradadores de diésel

Se pre-incubó 1 g de muestra de suelo en 100 mL de Medio Mineral Líquido (MML) cuya composición es (g/L): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, KH_2PO_4 3.0, $(NH_4)_2SO_4$ 3.0, NaCl 2 y 0.2 g/L de Tween 80, siendo suplementado con glucosa al 0.2% (m/V) y estando previamente esterilizado en autoclave a 120°C durante 20 min. A este cultivo se le denominó MMG y permaneció a 32 °C y 150 rpm por 18 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se extrajo 10 ml del cultivo inicial y se depositó en un Erlenmeyer con 90 ml de MML suplementado con glucosa al 0.2 %, tritón X-100 a una concentración de 150 mg/L y diésel al 1% (V/V), medio al que se le denominó MMDG. A partir de los cultivos en MMG y MMDG, se realizaron diluciones seriadas hasta 10-5, así como las respectivas siembras de superficie en placa. Para la elaboración de medios sólidos en placa, se prepararon los mismos medios líquidos adicionándole 1.5% de agar, conformándose los denominados AMG y AMDG. Las placas se dejaron en una cámara incubadora JP Selecta 2000210 por 5 días a 25°C. Posteriormente, se hicieron réplicas de los cultivos de las placas con AMDG hasta conseguir cepas puras. Los cultivos líquidos precursores permanecieron en agitación a 180 rpm hasta alcanzar una concentración de microorganismos correspondiente a la de la fase exponencial de la comunidad nativa mixta (3×10^8 cel/ml).

Caracterización microbiológica, bioquímica y molecular de cepas degradadoras de diésel

Se realizó la caracterización macroscópica de las cepas aisladas reportando la forma, borde, apariencia y pigmentación de las colonias. La caracterización microscópica se llevó a cabo mediante tinción Gram. Para la identificación de las cepas, estas fueron cultivadas en medios para pruebas bioquímicas. La caracterización molecular fue realizada mediante el aislamiento de ADN de cada una de las cepas, así como la amplificación del gen RNAr 16S, usando los cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1392R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'), mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) haciendo uso de un termociclador BioRad. La secuenciación fue realizada siguiendo el método Sanger acoplado a Big Dye terminator v3.1 y corridos en un secuenciador ABI 3770xl. Las secuencias fueron comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank.

Ensayos de determinación de parámetros de actividad degradativa

Una vez obtenido el pre-inóculo del consorcio como el de las cepas aisladas, se establecieron sistemas reactores en frascos de vidrio provistos con 500 ml de medio MMDG. Se inoculó 1 ml del consorcio a una concentración de 3×10^8 cel/ml en 5 de frascos. Se utilizó un frasco por día (0, 2, 5, 8 y 13) con el fin de extraer la cantidad de muestra necesaria para los distintos ensayos; además se dispuso un frasco adicional sin inóculo que sirvió como testigo o control abiótico. El mismo procedimiento fue llevado a cabo para las cepas aisladas. Los sistemas se incubaron en agitación horizontal a 150 rpm/min en un agitador orbital GEHAKA A0-370 a 25°C por 13 días. Los ensayos realizados fueron: determinación de hidrocarburos presentes en el medio de cultivo por método de

extracción por solvente con diclorometano, determinación de glucosa por el método Glucosa PAP-SL/Espectofotómetro, medida del pH por método potenciométrico y cuantificación del crecimiento microbiano por recuento en cámara de Neubauer.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención y caracterización de muestra

Las características fisicoquímicas del suelo recolectado contaminado con diésel se muestran en la Tabla 1. Investigaciones concluyeron que los suelos franco-arcillo-arenosos favorecen la biodegradación debido a su mayor capacidad de retención de humedad, disponibilidad y contacto microorganismo-hidrocarburo (1)(2), además Santos Jallath (2007) reportó que valores de pH entre 7.4 a 7.7 son favorables para procesos de biodegradación en suelos (3). La concentración de nitrógeno total en las muestras de suelo analizadas, presentan niveles relativamente muy altos y según Ellis y Adams (1960), se encontraron grandes incrementos del nitrógeno, es característico de suelos contaminados con gas natural o crudo comparado con suelos normales (4).

Tabla 1. Características fisicoquímicas del suelo. Fuente: Elaboración propia

Análisis	Unidad	Método de Ensayo	Resultado
Textura	-	UNE 77314:2001	Franco - arcilloso - arenoso
pH	-	Método pH métrico	7.25
Nitrógeno	%	Método 2.057 de la AOAC.	0.66
Materia Orgánica	%	Método Walkley Black	0.77
Fósforo Total	ppm	Método Colorimétrico de la AWWA	38.21
Lubricantes y Combustibles	ppm	Método de Extracción por Solventes	68597.84
Conductividad	mS/cm	Método Potenciométrico	5.23

Los estándares de calidad ambiental de la normativa peruana (ECA MINAM DS 011-2017) indican que la medida máxima de los niveles de concentración de hidrocarburos de petróleo correspondiente a la fracción media de hidrocarburos (>C10-C28) para el uso de suelos de tipo comercial/industrial/extractivo no deben exceder los 5000 mg/kg, encontrándose el diésel dentro de estos ya que tienen una estructura C-10 a C-23 (5). Las muestras de suelo analizadas presentan una concentración promedio de hidrocarburos de 68597,84 mg/kg, lo que indica niveles de contaminación excesivamente altos (6) y la necesidad de un tratamiento.

Aislamiento de microorganismos degradadores de diésel

A partir de los repiques se logró obtener dos colonias aisladas, aparentemente distintas, siendo denominadas Cepa CR y Cepa CB. Se sembraron en medio AMG y AMDG encontrándose una diferencia estadísticamente significativa ($t=0.0001$) a un 95% de confianza entre la cantidad de población que creció en placas con AMG (1.15×10^7) y la cantidad de población que creció en placas con AMDG (2.74×10^7). Demostrándose que la adición o restricción de distintos tipos de sustratos, como la glucosa y diésel, limitan el crecimiento poblacional (7). Esto también ocurrió con las cepas cultivadas en los medios MMG (con glucosa como única fuente carbonada) y MMDG (con diésel y glucosa), lo que permite presumir la adaptación de las cepas a un sustrato limitante para asegurar su reproducción, mientras que otras mueren sin dejar descendencia (8).

Caracterización microbiológica de bacterias degradadoras de hidrocarburos

Se desarrollaron dos tipos de colonias bacterianas aparentemente diferenciadas por sus características fenotípicas (Cepa CR y Cepa CB), las cuales son mostradas en la Fig. 1. Las características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas que presentaron las dos cepas aisladas, se detallan en la Tabla 2.

Fig. 1. A) y B): Vista macroscópica de Cepa CR y CB en placa. a) y b) Vista microscópica de Cepa CR y Cepa CB a 100 X

Tabla 2. Características macroscópicas y microscópicas de cepas aisladas. Fuente: Elaboración propia.

Microorganismo	Características Macroscópicas	Características Microscópicas	Características Bioquímicas
Cepa CR	Redonda, convexa, lisa, cremosa, de pigmentación rosa.	Cocos Gram positivos formando tétradas y en pares	Hemólisis (γ); Catalasa (+); Movilidad (-); Coagulasa (-); Oxidasa (+); Tolerancia a sal (S); Bacitracina (S); OF (-)
Cepa CB	Redondas, convexas, lisas, cremosas, de pigmentación blanca.	Bacilos Gram negativos	Mc Conkey (+), Oxidasa (+), Lactosa (-) Lisina (+), Arginina (+) Indol (-)

De acuerdo a los resultados de caracterización molecular y pruebas bioquímicas desarrolladas, la cepa CR pertenece al grupo de Micrococcales

(ggggcgtggcgggcgccctacacattgcagttcgagcggtaaca ccaggccttggtgctcgtatgtgacgaggagcggatgagtgtatc atgtgtgctcgcggcctgctgaggggatataactcctgaaacggcctattg ccgataatcttcgtatgcaggggggtacacagacctcttcggtgtcat ggcccgaggtggaactagctgataagtggtgggtagtgtgttca ccggcgctacaatgcctcgtgctgtgacaggtgacagccga tcgggaactgagacacgggaccaaattccacggaaggaaagc gagggggaatatgtgcaactggcggaatgcatgtgtcccatg caccgggtatgagaaaggccttcgggttttaaaatcctttaa ctggggagaaggaagaaagtgtaccacctaataatgtcgttt cactacgagtcagcagccgctcacttcgtgacagctgcccgttattcc gaattatgcaggcgttaagcgtagtactggttgcgaggtactgggacgt ctgtacgctcttatgtgagatgcgcgagctcaccgtgcgacct gagttcgacactggaaagtggaaagtctgtagacgggggaggaa gttagatgtcgcgaggaaactgcgatgagatctgaagaactca gggtcgccactgacgcccctagataaaggctggcgctcaagtgtgatta cctaccgagctaacaggattagatatcctagtcacacacccagccata tcgactagtgcctgatgctgtgattgctcttactctggcgattacgtatcg cgtccgactcgccgctattgatacaaatctgtaactgacggattgaccggcata cgtcgaagcgtgtgtttatttctataatcgtgacacttaacaactcatgaca tctggacaactcattgcacactcattagtgcgtgctgactctggaga cagctgctgcatggcgctggtggccttaacgtcgggtaattgttcgggat aaagtcgcgcctcactgttcccaacaccttattcctttgtatctccttggt tcccctcgccgtacctctacgccgaacttaagggggggtaaaattgacaaaa acagggagggggaggctgtgtatgttttttttctcccttgcctcactttgt gggtcctcctcccccgcacgccccccacctgtgtcctcccccactaa ggagaggggagggaaaaagaaaagaaagccccctctcacaagaaaa aaaacccccgcg)

Se reportó un caso de bacterias capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos, pertenecientes a la especie de Micrococcales, por lo que se cree que al tener estos antecedentes, las colonias CR corresponderían a esta taxonomía (9) y según las pruebas bioquímicas realizadas, indican que el microorganismo CR corresponde a *Kocurea Rosea* (10) de metabolismo de carácter oxidativo y capaz de crecer en varios hidrocarburos aromáticos policíclicos como el naftaleno (11). La cepa CB formaría parte del grupo de las Proteobacterias que, en su mayoría, son del tipo gram negativas y según sus pruebas bioquímicas correspondería a la cepa *Burkholderia pseudomallei* poseen similar acción a las Alphaproteobacterias, las cuales son capaces de

metabolizar cadenas carbonadas, también se encuentran a las *Gallaeimonas pentaromatorans*, las cuales degradan hidrocarburos aromáticos policíclicos de cuatro y cinco anillos de alta masa molecular (10).

Ensayos de determinación de parámetros de actividad degradativa

Comprende el monitoreo del crecimiento microbiano (Fig. 2), la degradación de diésel en medio de cultivo líquido MMDG (Fig. 3), concentración de glucosa en el medio (Fig. 4) y del pH.

Fig. 2. Curva de crecimiento de microorganismos nativos en medio líquido MMDG

Dónde: CR = Cepa Rosada, CB = Cepa Blanca, CN = Consortio nativo, B1 = Blanco Cepas y B2 = Blanco Consortio

La Fig. 2 muestra la tendencia de crecimiento tanto del consorcio microbiano como de las cepas individuales aisladas y sus respectivos blancos y según ANOVA existe una diferencia estadísticamente significativa entre el crecimiento microbianos de los tres sistemas a un 95 % de nivel de confianza. La máxima concentración de población microbiana por la cepa CR (*Kocurea Rosea*) ocurrió en el día 8, registrando un valor promedio de 1.458×10^7 cel/mL; mientras que para la cepa CB (*Burkholderia pseudomallei*) ocurrió al día 13 y para el consorcio mixto CN en el día 10 de experimentación (7.52×10^6 cel/mL). Según la tendencia del crecimiento de las cepas aisladas se podría afirmar que, al tratarse de cultivos puros, estos se ven favorecidos al tener mayor disponibilidad de ambos sustratos en el medio de cultivo líquido (glucosa y diésel); mientras que para el consorcio nativo mixto CN, evidenciaría que existe competencia por el sustrato orgánico disponible entre los microorganismos que lo conforman, pues generalmente se espera que los consorcios tengan mayor concentración microbiana y, en este caso, sucede de forma contraria. El resultado de esta competencia determinaría los productos finales de los procesos de mineralización involucrados en los momentos en que predomina una de las poblaciones.

Fig. 3. Degradación de diésel en medio de cultivo líquido MMDG con CR, CB, CN y Blanco

Dónde: CR = Cepa Rosada, CB = Cepa Blanca, CN = Consorcio nativo, B = Blanco

La Fig. 3 muestra la degradación de diesel por los tres sistemas propuestos y se observa que la capacidad de degradación difiere, según el microorganismo utilizado. El sistema que alcanza mayor biodegradación con respecto al blanco es el que contiene a la cepa CR (*Kocurea Rosea*), alcanzando una concentración promedio de 51.27 ± 0.06 % de diésel presente en el medio, seguido del consorcio CN con 48.78 ± 0.07 % de diésel degradado y, finalmente el porcentaje de degradación de la cepa CB (*Burkholderia pseudomallei*) fue de 32.84 ± 0.10 % con respecto al tiempo de contacto en el medio de cultivo, esto es, a un 95% de nivel de confianza existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos de las cepas y el consorcio. El género *Micrococcus sp.* También se ha visto que degrada diésel de petróleo, mostrando buen desempeño individualmente como en consorcio. También se pudo observar que el porcentaje de diésel residual en el medio de cultivo disminuye a medida que aumenta la concentración de biomasa bacteriana (12). Además en estudios de biodegradación, en ambientes marinos artificiales, se ha conseguido una degradación de hasta 47.7% en nueve días usando cultivos mixtos conformados por *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, mientras que otros autores reportan en siete días o varias semanas dependiendo de la complejidad del sustrato hidrocarbonado (13).

La Fig. 4 muestra la variación de las concentraciones de glucosa en el tiempo, sustrato usado para que las cepas se adapten al medio de cultivo enriquecido. Tanto para la Cepa CB (*Burkholderia pseudomallei*) como para el consorcio CN, se puede observar que la disminución de glucosa en el medio influye en el aumento del crecimiento de microorganismos; prosperando en el sustrato diésel cuando se encuentra como principal fuente de carbono y energía, con una reducción visual gradual de la capa de diésel en incubación prolongada. Asimismo, la glucosa actuaría como la fuente de carbono inicial, un sustrato de metabolismo rápido para microorganismos que están en periodo de aclimatación al medio de cultivo artificial. Las fluctuaciones en el caso del consorcio pueden ser debido a la intervención de la Cepa CR (*Kocurea Rosea*) en el consumo de glucosa y consecuente generación de metabolitos o productos secundarios en la fase de adaptación al metabolismo del contaminante (12).

Fig. 4. Concentración de glucosa en medio de cultivo líquido de sistemas CR, CB, CN y B.

Dónde: Dónde: CR = Cepa Rosada, CB = Cepa Blanca, CN = Consorcio nativo, B = Blanco

Otro parámetro de actividad biodegradativa de hidrocarburos es la variación del pH cuyo valor inicial de 5 varió en los tres sistemas debido al metabolismo de las cepas que influye de manera directa en el pH del medio. Las bacterias aisladas se caracterizan por ser acidobacterias ya que toleran pH ácidos, es así que la cepa CR (*Kocurea Rosea*) disminuyó el pH del medio de 4.55 a 4.46; mientras que la cepa CB (*Burkholderia pseudomallei*) mostró rangos de pH desde 4.69 a 4.61 y el consorcio CN registró los valores más bajos de pH probablemente a la interacción entre ambas cepas y sus metabolitos generados con valores de 4.78 a 3.63. Las respuestas de tolerancia al ácido son iniciadas por un mecanismo sensible a los inhibidores de la síntesis proteica y puede estabilizar el pH interno por sobre 5.0, teniendo un pH externo con valores de hasta 4.0. La pérdida de la actividad ATPasa, causada por las mutaciones que desorganizan genes o los inhibidores metabólicos, anula la respuesta de tolerancia al ácido, pero no el mecanismo homeostático. Es probable que la pigmentación de la cepa CR (*Kocurea Rosea*) sea la expresión de un metabolito secundario que confiera a la célula capacidad de tolerancia a los agentes adversos u otras propiedades (14).

CONCLUSIONES

Se aislaron dos cepas CR y CB a partir de suelo contaminado con diésel que según las pruebas microbiológicas, bioquímicas y molecular corresponden a *Kocurea Rosea* y *Burkholderia pseudomallei*, respectivamente.

Se determinó la capacidad degradativa de las cepas *Kocurea Rosea*, *Burkholderia pseudomallei* y del consorcio usando el medio de cultivo MMDG con una concentración inicial de diésel de 1%, concentración de glucosa de 0.2%, concentración microbiana de 3×10^8 cel/ml para las cepas individuales y del consorcio en sistemas reactores. El valor del pH varió ligeramente durante el proceso de biorremediación de 4.78 a 3.63 para el CN, de 4.69 a 4.61 para *Burkholderia pseudomallei* y de 4.55 a 4.46 para *Kocurea Rosea*.

Los tres sistemas propuestos si mostraron una capacidad degradativa de diésel, de ellos la cepa *Kocurea Rosea* fue la que tuvo mayor degradación de diésel con un valor promedio de 51.27 ± 0.06 %, le sigue el consorcio nativo con un 48.78 ± 0.07 % y la de menor capacidad degradativa fue la cepa *Burkholderia pseudomallei* con un 32.84 ± 0.10 % en un tiempo de residencia de 13 días. Los análisis estadísticos muestran que existe una diferencia estadísticamente significativa a un 95% de nivel de confianza entre los tres sistemas propuestos.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María quien financió el presente proyecto con código de Resolución 21941-R-2015.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García MG, Infante C, López L. Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferente textura con y sin agente estructurante. *Bioagro*. 2012;24(2):93-102.
2. Kristensen AH, Henriksen K, Mortensen L, Scow KM, Moldrup P. Soil Physical Constraints on Intrinsic Biodegradation of Petroleum Vapors in a Layered Subsurface. *Vadose Zo J* [Internet]. 2010 [citado 1 de agosto de 2018];9(1):137. Disponible en: <https://www.soils.org/publications/vzj/abstracts/9/1/137>
3. Santos Jallath JE. Caracterización de suelos contaminados con hidrocarburos en una empresa minera y desarrollo de un método biológico para su remediación. Universidad Nacional Autónoma De México; 2007.
4. Ellis R, Adams RS. Contamination of soils by petroleum hydrocarbons. Department of Agronomy, Kansas State University, Manhattan. En: *Soil Sci Soc Am Proc* 26. 1960. p. 197-216.
5. León N, Infante C, Arias M, Márquez M, Gorrín A, McMillen SJ, et al. Biodegradability of Venezuelan crude oils. En: *SPE International conference on health, safety, and environment in oil and gas exploration and production*. Society of Petroleum Engineers; 1998.
6. Ministerio del Ambiente P. Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo [Internet]. El Peruano. 2017 [citado 29 de julio de 2018]. Disponible en: http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/12/DS_011-2017-MINAM.pdf
7. Erdogan EE, Sahin F, Karaca A. Determination of petroleum-degrading bacteria isolated from crude oil-contaminated soil in Turkey. *African J Biotechnol*. 2012;11(21):4853-9.
8. Miller GT. *Living in the Environment: Principles, Connections, and Solutions*, Brooks. Cole Publishing Company, Pacific Grove; 2000.
9. Yetty E, Thontowi A. Polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from the Indonesian Marine Environment. *Biodiversitas, J Biol Divers* [Internet]. 2016;17(2):857-64. Disponible en: <http://biodiversitas.mipa.uns.ac.id/D/D1702/D170263.pdf>
10. Koneman EW, Allen S. Koneman. *Diagnostico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana; 2008.
11. Ahmed R, Ahmed N, Gadd G. Isolation of two *Kocuria* species capable of growing on various polycyclic aromatic hydrocarbons [Internet]. Vol. 9, *African Journal of Biotechnology*. Academic Journals; 2002 [citado 16 de octubre de 2018]. 3611-3617 p. Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/82441>
12. Otiniano García N. Eficiencia de *Pseudomonas* sp, *Rhodopseudomonas* sp, *Micrococcus* sp y *Bacillus* sp empleados como cultivos individuales y en consorcio, en la degradación de petróleo diesel II [Internet]. [citado 9 de octubre de 2018]. Disponible en: [http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/5915/Tesis_Doctorado - Nélida Otiniano García.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/5915/Tesis_Doctorado_-_Nélida_Otiniano_García.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
13. Mariños Salas CE. “Efecto de la temperatura y del pH sobre la degradación del petróleo diesel 2 por *Pseudomonas* sp. en solución mínima de sales”. 2014;
14. Diaz Mora CP. Cinética bacteriana de cinco cepas degradadoras de hidrocarburos y su consorcio, en diferentes condiciones de PH y temperatura, a nivel de laboratorio y biofermentador para la producción piloto semindustrial. *SANGOLQUÍ/ESPE/2007*; 2007