



Artículo Original

Efecto de las concentraciones del surfactante Polioxietileno (20) Monooleato de sorbitán "Tween 80" en la biodegradación de petróleo Diesel II en suelo por *Pseudomonas aeruginosa*

Effect of the concentrations of surfactant Polyoxyethylene (20) Sorbitan monooleate "Tween 80" on Diesel II oil biodegradation in soil by *Pseudomonas aeruginosa*

Diana Periche Fiestas¹ y Heber Robles Castillo²

¹Tesista EAP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

El proceso de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados utilizando surfactantes está condicionado al tipo y concentración de éste. En la presente investigación se determinó el efecto del surfactante Polioxietileno (20) Monooleato de sorbitán "Tween 80" en la biodegradación de petróleo Diesel II, en suelo, utilizando *Pseudomonas aeruginosa*. La muestra de suelo estuvo constituida por arena recolectada del Puerto de Salaverry (Perú) la cual, luego de su tratamiento, se colocó (1.950 Kg) en cada uno de los cuatro biorreactores, de 3 Kg de capacidad. A cada biorreactor se le agregó petróleo Diesel II al 5% y 50 mL de *P. aeruginosa*. Al biorreactor 1, considerado como el control, no se le agregó surfactante y a los demás (2, 3 y 4) sí, al 0.1%, 0.5% y 1.0%, respectivamente. En un periodo de evaluación de 15 días, se determinó: (i) los Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) mediante el método Soxhlet, (ii) el porcentaje de eficiencia en la biodegradación a través del método de Gerber y (iii) el número (recuento microbiano) mediante el método estándar del recuento en placa por superficie. Se encontró: (i) diferencia significativa entre los tratamientos y el control, (ii) que cuando se aplicó "Tween 80" al 0.1% y al 0.5% hubo una eficiencia similar (90.48%, 80.13% respectivamente), (iii) diferencia significativa entre los días de evaluación, con mayor biodegradación en los primeros siete días y (iv) que cuando se aplicó "Tween 80" al 0.1% se dio un mayor crecimiento microbiano a los 9 días (39×10^{10} UFC/g). Se concluye que "Tween 80" tiene efecto positivo en la biodegradación, y que la concentración óptima para éste proceso es al 0.1%.

Palabras clave: Biodegradación, surfactante, Tween 80, Diesel II, *Pseudomonas aeruginosa*, biorreactor

ABSTRACT

The process of hydrocarbon biodegradation in contaminated soils using surfactants is subject to the type and concentration of this. In this research, the effect of surfactant Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate "Tween 80" was determined in the biodegradation of petroleum Diesel II, on floor, using *Pseudomonas aeruginosa*. The soil sample consisted of sand collected from the Port of Salaverry (Peru) which, after treatment, was placed (1,950 kg) in each of the four bioreactors, 3 Kg capacity. Each bioreactor Diesel oil was added 5% II and 50 mL of *P. aeruginosa*. The bioreactor 1 considered the control will not be added surfactant and others (2, 3 and 4) if, at 0.1%, 0.5% and 1.0%, respectively. In a period of 15-day evaluation, it was determined: (i) the Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) by Soxhlet method, (ii) the percentage of biodegradation efficiency through the method of Gerber and (iii) the number (microbial) count using the standard plate count method for surface. It was found: (i) significant difference between treatment and control, (ii) similar efficiency (90.48%, 80.13%, respectively) when "Tween 80" was applied to 0.1% and 0.5%, (iii) more biodegradation in the first seven days, and (iv) when "Tween 80" was applied to 0.1% gave a greater microbial growth at nine days (39×10^{10} CFU/g). In conclusion, "Tween 80" has a positive effect on the biodegradation, and the optimum concentration for this process is 0.1%.

Keywords: Biodegradation, surfactant, Tween 80, Diesel II, *Pseudomonas aeruginosa*, bioreactor

INTRODUCCIÓN

La actividad industrial ha ocasionado uno de los problemas ambientales más importantes en la actualidad en materia de contaminación de ecosistemas acuáticos y terrestres, de modo tal que el vertido de hidrocarburos de petróleo y sus derivados ocupa uno de los primeros lugares debido a su baja velocidad de degradación natural^{1,2,3}. En el Perú, han afectado la biodiversidad típica de los ecosistemas a través de los derrames de petróleo, tal como sucedió en el oleoducto marino de Talara, el río Marañón que afectó la Reserva Pacaya-Samiria, la caleta de Zorritos-Tumbes el rompimiento del oleoducto Nor-Peruano debido a accidentes naturales y por la actividad extractiva⁴.

Se sabe que en el suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos, como evaporación y penetración que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida pueden ser procesos más o menos lentos lo que ocasiona una mayor toxicidad, con la consecuente reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal, cambios en la dinámica poblacional de la fauna y la biota microbiana y contaminación por infiltración de cuerpos de aguas subterráneas^{4,5,6,7,8}.

La biodegradación de hidrocarburos en suelos, dentro de ella la biorremediación microbiana, es una alternativa que puede emplearse tanto para el tratamiento, como para la disposición final de los residuos producidos por las refinerías del petróleo; estos sistemas de descontaminación se basan en la digestión de las sustancias orgánicas por los microorganismos, de la cual obtienen la fuente de carbono necesaria para el crecimiento de sus células y una fuente de energía para llevar a cabo todas las funciones metabólicas que necesitan sus células para su crecimiento y para que estos procesos metabólicos se lleven a cabo, es necesario que existan en las medias condiciones físico-químicas óptimas las cuales se ven influenciadas por la temperatura, pH, humedad, aceptores de electrones y nutrientes^{4,7,8,9,10,11,12,13}.

Las bacterias del género *Pseudomonas* poseen la habilidad para utilizar hidrocarburos como fuente de carbono y energía necesaria para su crecimiento, generando productos más sencillos²⁵. Estas bacterias son productoras de biosurfactantes como ramnolípidos involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados^{14,15}. *P. aeruginosa* es un microorganismo muy utilizado en biorremediación y presenta una serie de actividades naturales sobre xenobióticos y ha sido identificada como degradadora de n-hexadecano, mineralización de compuestos alifáticos en condiciones anaerobias y degradadora de hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos, así como del pireno in vitro^{16,17}.

En los últimos años se han desarrollado técnicas de remediación que incluyen el uso de surfactantes, que son moléculas anfipáticas que poseen la capacidad de interactuar con compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos a la vez y por lo tanto ubicarse en la interfase de los mismos, tanto a escala de laboratorio como a campo^{18,19,20}. Entre las propiedades de los surfactantes están: (i) emulsión, es un sistema termodinámicamente inestable y tiende a separarse en dos fases, estas emulsiones pueden reducir la tensión superficial, aumentar el metabolismo microbiano con el hidrocarburo y puede incrementar la actividad enzimática microbiana. A mayor emulsificación mejor solubilización de aceite en las micelas de surfactante, (ii) balance lipofílico-hidrofílico (HLB), es una expresión de la afinidad de la molécula del surfactante a la materia orgánica y a la fase acuosa. Cuanto mayor sea el HLB, mayor es la tensión superficial y la solubilidad, (iii) tensión superficial (TS) e interfacial (TI), la propiedad más importante del surfactante es su habilidad para adsorberse en interfaces. La TI entre dos líquidos depende de la fuerza de cohesión entre las moléculas de cada líquido y de la fuerza de adhesión entre las moléculas de un líquido y el otro, de esta manera, la tensión interfacial entre dos líquidos está relacionada con la tensión superficial de cada líquido saturado en el otro. Para disminuir la TI, los surfactantes actúan como un “puente” formando una tercera fase de “microemulsión” que favorece la interacción entre la fase acuosa y la del hidrocarburo. En el caso de TS, los surfactantes disminuyen debido a que interfieren en la formación de puente de hidrógeno y otras fuerzas involucradas en la adhesión entre moléculas, (iv) concentración micelar crítica, es la unión de micelas en un aumento de la conductividad eléctrica bajo diversos niveles de su concentración, su valor depende de la naturaleza del surfactante. Los mejores surfactantes son los que tienen valores menores de CMC. La formación de micelas mixtas entre surfactantes y otros compuestos como los hidrocarburos favorecen la dispersión del mismo en medio acuoso aumentando la biodisponibilidad, (v) movilidad, la remoción del petróleo es causado por la reducción de la tensión interfacial, (vi) solubilidad, es causada por las micelas, la solubilidad de los hidrocarburos es proporcional con las concentraciones de surfactantes, por encima de la CMC mejora y

(vii) punto nube, es la temperatura a la cual el surfactante disminuye hasta llegar a un valor crítico en el cual se genera enturbiamiento visible en solución acuosa^{18,19,20,21,22,23,24}.

Existen una gran cantidad de surfactantes disponibles en el mercado, pero muchos no son adecuados, incluso algunos de ellos podrían convertirse en contaminantes¹⁹. La aplicación de surfactantes es algo controvertido incluso en los casos que se logra con éxito la degradación, se ha dado lugar a debates sobre los riesgos de salud ambiental debido a la presencia de estos productos y la posibilidad de su biodegradación^{21,22}. La elección del surfactante o mezcla de surfactantes a ser utilizados en remediación de suelos depende de varios factores como el costo, la biodegradabilidad, la toxicidad, la absorción del surfactante a las moléculas del suelo, la concentración efectiva (<3%), la dispersión del suelo y la disminución en la tensión superficial que éste produzca^{22,24}. Muchos de los investigadores recomiendan el uso de surfactantes no iónicos ya que suelen tener menor toxicidad y mayor biodegradabilidad^{19,21,22,23}.

Uno de los surfactantes no iónicos es el Monooleato de sorbitán etoxilado conocido comercialmente como “Tween 80” es insoluble en agua, pero soluble en la mayoría de disolventes orgánicos y no se ionizan en solución acuosa²³. Tiene baja toxicidad y en general, baja fitotoxicidad. Forma emulsiones estables, considerado un agente espumante leve, no es afectado por la dureza del agua, adecuado para la biorremediación debido a su baja CMC^{24,25,26,27,28}. De acuerdo a Kang et al²⁵, este surfactante puede ser absorbido por el suelo y degradado por los microorganismos hasta en un 99.6%.

Por todo lo expuesto, la finalidad del presente estudio está orientado en evaluar el efecto de tres concentraciones del surfactante “Tween 80” en la biodegradación de petróleo Diesel II en suelo, utilizando *Pseudomonas aeruginosa*. Esto debido a la necesidad de buscar alternativas de solución frente a los grandes problemas de contaminación por derrames de petróleo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

- Cultivo puro de *Pseudomonas aeruginosa* proporcionado por la cátedra de Biotecnología del Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo.

Material no biológico

- Suelo proveniente del puerto de Salaverry. La Libertad-Perú.
- Petróleo Diesel II.
- Surfactante Polioxietileno (20) Monooleato de sorbitán “Tween 80”-Merck.

Los biorreactores²⁸.

Se construyeron cuatro biorreactores de plástico, de forma rectangular para albergar 2 Kg. de la muestra de suelo, de medidas 10 x 15 x 20 cm. con tapa calada para entrada de aire y luz. Uno para el biorreactor control y tres para biorreactores problema.

Recolección y tratamiento de suelo²⁶.

La muestra de suelo fue recolectada cerca de la orilla del mar en el Puerto de Salaverry, La Libertad-Perú; se realizó 15 muestreos de diferentes puntos al azar, y en cada punto a una profundidad de 10 cm, se recolectó 2 Kg de suelo, y se colocó en un saco limpio previamente rotulado, haciendo un total de 30 Kg. aproximadamente, luego fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo (Perú) para su tratamiento inmediato. El suelo fue cernido en una malla N°10 (apertura de 2 mm) para eliminar partículas grandes e impurezas, y se homogenizó para obtener partículas de igual tamaño. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiental (20°C ± 2), con la finalidad de reducir humedad. Luego se esterilizó en bolsas a 121°C por 20 min, con la finalidad de eliminar la población microbiana nativa.

Reactivación, propagación y estandarización de *Pseudomonas aeruginosa*²⁹.

De un cultivo puro se reactivó en agar *Pseudomonas*, y se incubó a 37°C por 24 horas, pasado este tiempo se observó sus características culturales macroscópicas, posteriormente se realizó frotis a partir de éstas y se le hizo coloración Gram para observar sus características microscópicas como: bacilos Gram negativos, rectos o ligeramente curvados- Luego, que se confirmó su viabilidad se procedió a la propagación en agar nutritivo, con la finalidad de incrementar la biomasa microbiana. Después se realizó la estandarización, en un volumen de 200 mL de agua destilada estéril equivalente al tubo N° 2 del Nefelómetro de MacFarland (6 x 10⁸ UFC/mL). Posteriormente, se realizó el método de recuento en placa por superficie para obtener un conteo real

Contaminación del suelo con petróleo Diesel II.

Una vez armados y debidamente esterilizados los cuatro biorreactores, en cada uno se colocó 1.950 Kg de suelo estéril y se agregó petróleo Diesel II al 5% (100 mL), luego se mezcló hasta homogenizar.

Preparación de los sistemas de evaluación.

Los biorreactores conteniendo el suelo contaminado, se acondicionaron de la siguiente manera:

- Biorreactor 1: No se le hizo tratamiento con el surfactante ya que es considerado como el biorreactor control.
- Biorreactor 2: Se adicionó 2 mL. de surfactante (0.1%) disuelto en agua.
- Biorreactor 3: Se adicionó 10 mL. de surfactante (0.5%) disuelto en agua.
- Biorreactor 4: Se adicionó 20 mL. de surfactante (1.0%) disuelto en agua.

Luego en los biorreactores 2, 3 y 4; se mezcló el suelo con la solución. Después a los cuatro biorreactores se les inoculó con 50 mL de *P. aeruginosa* (72×10^7 UFC/mL). Luego se taparon los biorreactores y se les dejó a temperatura ambiental ($19^\circ\text{C} \pm 2$)

Evaluación del efecto del surfactante, sobre la biodegradación del petróleo Diesel II.

Para ello se realizó la determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP), determinación de porcentaje de eficiencia en la biodegradación de materia orgánica (Diesel II); así como determinación del crecimiento microbiano de *P. aeruginosa*.

- **Determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP):** Se realizó cuatro muestreos, el primer día de agregado el inóculo, luego se hizo cada 7 días hasta completar 14 días; se tomó una muestra de 100 g. de cada uno de los biorreactores. Se aplicó el Método Soxhlet⁴.
- **Determinación de porcentaje de eficiencia en la biodegradación:** La eficiencia se evaluó empleando el Método de Gerber, indicándose al inicio y al final en un periodo de 14 días de tratamiento⁴⁰.

$$\begin{aligned} \% \text{ eficiencia} &= \text{MOc} / \text{MOi} \times 100 \\ \text{MOc} &= \text{MOi} - \text{MOf} \end{aligned}$$

Donde: MOc = Materia orgánica consumida (% de petróleo v/v), MOi = Materia orgánica inicial (% de petróleo v/v), MOf = Materia orgánica final (% de petróleo v/v)

- **Determinación del recuento microbiano de *Pseudomonas aeruginosa*:** Se realizó cuatro muestreos, el primer día de agregado el inóculo, luego cada 3 días hasta completar 15 días. Se realizó diversas diluciones y se aplicó el Método de recuento en placa por superficie, utilizando Agar nutritivo, luego se incubó a 37°C por 24 horas. Los datos fueron ingresados al software Microsoft office Excel Profesional 2008 para elaborar la curva de crecimiento³⁰.

Evaluación estadística.

A los resultados de la determinación de HTP, consumo de materia orgánica y recuento de microorganismos a las diferentes concentraciones del surfactante, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para la comparación de promedios y obtención de la diferencia significativa.

RESULTADOS

El promedio del porcentaje de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) se mostró diferente (con significancia estadística, $p < 0.05$) entre los tratamientos y el control; asimismo, hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los días de evaluación, en donde los primeros 7 días hay una mayor biodegradación del petróleo (Fig. 1).

En relación al porcentaje de eficiencia en la biodegradación (Fig. 2) también se encontró diferencia significativa ($p = 0.0017$), entre los tratamientos y el control: cuando se aplicó "Tween 80" al 0.1%

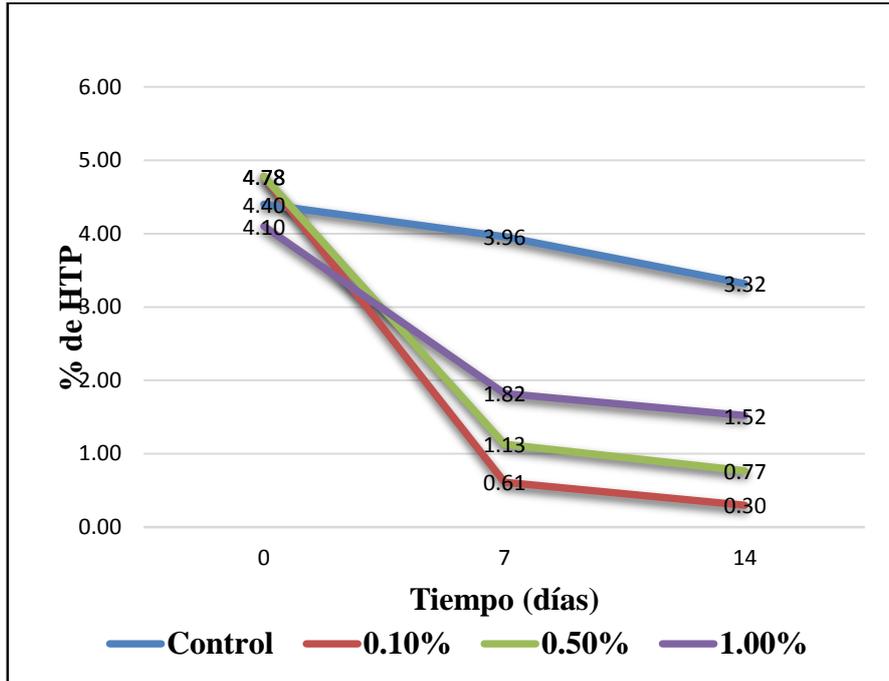


Fig. 1. Promedio de porcentajes de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) durante el proceso de biodegradación de petróleo Diesel II en suelo, por *Pseudomonas aeruginosa*, empleando diferentes concentraciones de "Tween 80" durante 14 días a temperatura ambiental ($19^{\circ}\text{C} \pm 2$). $p = 0.0098$. Si existe diferencia significativa.

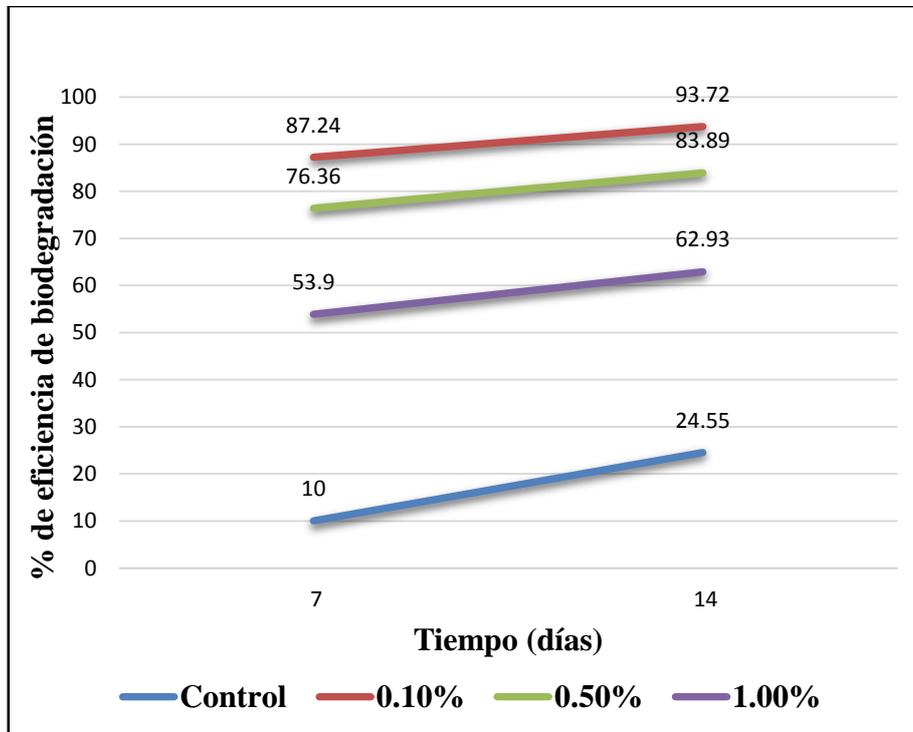


Fig. 2. Porcentajes de eficiencia en la biodegradación de petróleo Diesel II en suelo, por *Pseudomonas aeruginosa*, empleando diferentes concentraciones de "Tween 80" durante 14 días a temperatura ambiental ($19^{\circ}\text{C} \pm 2$). $p = 0.0017$. Si existe diferencia significativa.

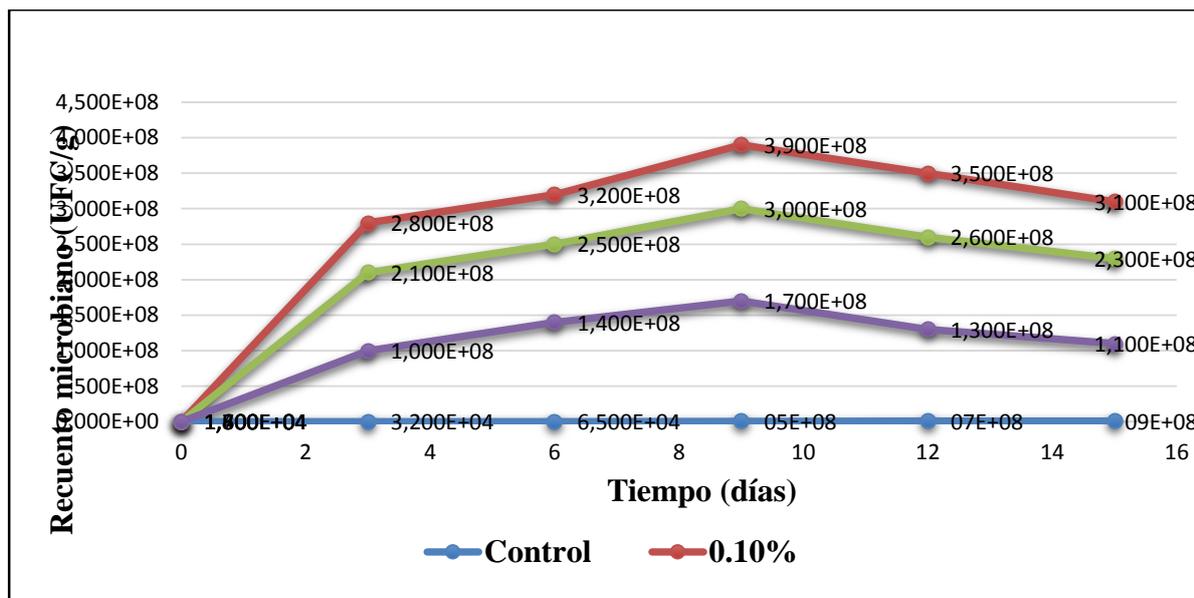


Fig. 3. Promedio de recuentos microbianos de *Pseudomonas aeruginosa* durante el proceso de biodegradación de petróleo Diesel II en suelo, empleando diferentes concentraciones de “Tween 80” durante 15 días a temperatura ambiental ($19^{\circ}\text{C} \pm 2$).

hubo una mayor eficiencia (90.48) pero, cuando se aplicó “Tween 80” al 0.5% su eficiencia fue similar (80.13); a diferencia de cuando se aplicó “Tween 80” al 1.0% (58.42).

Respecto del promedio del recuento bacteriano de *P. aeruginosa*, se observó que hasta el día 9 hay crecimiento microbiano; asimismo, que la mayor densidad microbiana fue cuando se aplicó “Tween 80” al 0.1% con un crecimiento de 39×10^{10} UFC/g de suelo, en cambio la menor densidad microbiana fue cuando se aplicó “Tween 80” al 1.0% con un crecimiento de 17×10^{10} UFC/g de suelo (Fig. 3).

DISCUSIÓN

Cuando se hace referencia a la biorremediación, además de considerar las vías degradativas de los microorganismos que llevan a cabo la detoxificación de los contaminantes, es necesario considerar otros factores que influyen en el rendimiento de la biorremediación; es decir, no es suficiente adicionar microorganismos con alta eficiencia degradativa, si existen factores que limiten su verdadero potencial, uno de estos factores es la biodisponibilidad del contaminante^{21,31}.

Esta biodisponibilidad se puede lograr con el uso de surfactantes; múltiples estudios^{32,33,34} han indicado que los surfactantes no iónicos (Tween 80) son los más efectivos para la eliminación de contaminantes orgánicos en los suelos por su capacidad de solubilización y biodegradación, suelen tener menor toxicidad y no son afectados por la dureza del agua. Para poder tener biodisponibilidad de petróleo Diesel II y por ende posterior biodegradación, se utilizó tres concentraciones de “Tween 80”.

La capacidad de biodegradación de un compuesto (Diesel II) por un microorganismo en este caso *P. aeruginosa* puede determinarse midiendo directamente la concentración residual del hidrocarburo³⁵; es así que para ello se utilizó el método Soxhlet, que permite medir el porcentaje de Hidrocarburos Totales de Petróleo; el hecho de hallar que existe diferencia significativa entre los tratamientos y el control, indica que el uso de “Tween 80” tiene un efecto positivo en la biodegradación; esto debido a que tiene propiedades que permiten que *P. aeruginosa* tenga mayor biodisponibilidad del Diesel II. Propiedades como una baja concentración micelar crítica (CMC), que es la concentración mínima de un agente surfactante capaz de formar micelas, lo que le permite la movilización del hidrocarburo^{23,31,34}, entonces, los mejores surfactantes son los que tienen valores menores de CMC en menor volumen y concentración (la concentración del surfactante fue de 0.5%). Es decir, por esta propiedad, cuando se aplicó “Tween 80” al 0.1%, los resultados que se obtuvieron fueron un menor porcentaje de HTP.

Así mismo, se ha reportado que los surfactantes con un mayor HBL (Balance Lipofílico-Hidrofílico) dan lugar a una mayor solubilidad y son adecuados para la solubilización de hidrocarburos en suelo.

Otra propiedad es la baja tensión superficial, es así que Riojas et al.²² analizaron la TS (Tensión superficial) de las concentraciones de “Tween 80” y llegaron a la conclusión que a menor dosis mayor TS. Esto es contradictorio al resultado obtenido en este trabajo ya que se dio mayor biodegradación en la concentración menor (0.1%) del surfactante, teniendo éste una mayor TS.

En el control también hubo disminución del porcentaje de HTP, esto puede ser debido a que *P. aeruginosa* es una bacteria productora de biosurfactantes como los ramnolípidos, involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados, como los hidrocarburos. La producción de biosurfactantes facilita que los hidrocarburos entren en contacto directo con la membrana para que sean interiorizados y puedan actuar las oxigenasas, acelerando por tanto el proceso de biorremediación^{28,29,35}. Muchos microorganismos implicados en estos procesos poseen sistemas enzimáticos para degradar y utilizar el petróleo diesel como una fuente de carbono y energía³¹. Estas enzimas pueden ser peroxidasas y oxigenasas, que permiten la oxidación más o menos específica de algunas fracciones del petróleo. Esta oxidación cambia las propiedades de los compuestos, haciéndolos susceptibles de ataques secundarios y facilitando su conversión a bióxido de carbono y agua, basta una oxidación para disminuir su toxicidad³².

El hecho que en los primeros siete días se dio el mayor porcentaje de eficiencia en la biodegradación; podría deberse a que en un inicio ocurre la degradación de las fracciones menos complejas, y más fáciles de degradar, y posteriormente ocurre la degradación de las fracciones más recalcitrantes¹¹. Esto también puede deberse a que como “Tween 80” es un surfactante biodegradable, y a este periodo de tiempo ya las bacterias lo están degradando y por eso baja el porcentaje de eficiencia en la biodegradación. Torres et al.³² informan que “Tween 80” es un surfactante altamente biodegradable y que alrededor del 45% de éste se degrada en un periodo de 168 hrs. Wong et al.³¹ señalan que *P. aeruginosa* cuando se combina con “Tween 80” mejora de manera efectiva la solubilidad y degradación del hidrocarburo. Así mismo, algunos autores reportan que el proceso de degradación del petróleo se puede llevar a cabo desde días hasta meses.

Cuando se aplicó “Tween 80” al 0.1% y al 0.5% existe un promedio de eficacia de biodegradación similar, siendo mejores que cuando se utilizó el “Tween 80” al 1.0%. Pero el mayor porcentaje de eficiencia de biodegradación fue cuando se utilizó la dosis menor (0.1%), esto nos indica que sería la dosis más eficiente; similar resultado reporta Torres y col⁵⁵ que señalan que el mejor resultado para la biorremediación es cuando se aplica una dosis menor de surfactante (las dosis fueron de 0.1, 0.5 y 1%). También se ha reportado que con una dosis de 0.2% de surfactante es suficiente para la biodegradación del suelo contaminado con hidrocarburos y se ha indicado que la mejor eficiencia de biodegradación no siempre está relacionada con el empleo de una alta concentración de surfactante, ya que una alta concentración puede inhibir la biodegradación. En el mismo sentido, se ha señalado que a una alta concentración de surfactante, el sustrato no está disponible porque se encuentra en la fase micelar, las moléculas del sustrato tienen que ser transferidas de la fase micelar a la fase acuosa para que sean biodisponibles para los microorganismos^{23,29,33}.

El proceso de biodegradación, también puede medirse de manera indirecta, ya que se presentan una serie de fenómenos que sirven como indicadores de que la materia orgánica contaminante está siendo degradada, por ejemplo el crecimiento de *P. aeruginosa* empleando como única fuente de alimentación a Diesel II³⁵.

P. aeruginosa alcanzó densidades poblacionales máximas que van desde 17×10^{10} UFC/g hasta 39×10^{10} UFC/g. Una de las posibles causas del incremento de la biomasa microbiana luego de un tiempo de exposición al contaminante es que éstas son capaces de degradar los hidrocarburos a formas menos tóxicas al emplearlas como fuente de carbono, para la síntesis de nuevas células. También se ha demostrado que las bacterias oxidantes del petróleo aumentan de 10^3 a 10^6 veces poco tiempo después de un derrame, similar al resultado obtenido en los primeros tres días, que hubo un incremento de la biomasa, de 10^6 a 10^{10} *P. aeruginosa*. Asimismo, se observó que hubo crecimiento hasta el día nueve, luego empieza a bajar la biomasa microbiana; esto puede deberse al agotamiento progresivo de la fuente de carbono (diesel). En conclusión: (i) las concentraciones 0.1%, 0.5% y 1.0% de “Tween 80” tienen un efecto positivo en el proceso de biodegradación de petróleo Diesel II en suelo, por *P. aeruginosa* y (ii) así la concentración óptima de “Tween 80” es al 0.1% y se puede recomendar que en futuras investigaciones: (i) se deben evaluar y determinar la mejor mezcla de surfactantes que contribuyan a una mayor capacidad de biodegradación y (ii) se debe comparar el efecto de biosurfactante y el efecto de surfactantes químicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez A, Pérez ME, Pinto J, Gurrola BA, Osorio AL. Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Rev Int Contam Ambient.* 2011; 27(3): 241-252.
2. Kaczorek E, Cieslak K, Bielicka K, Olszanowski A. The Influence of Rhamnolipids on Aliphatic Fractions of Diesel Oil Biodegradation by Microorganism Combinations. *Indian J Microbiol.* 2013; 53(1): 84-91.
3. Sarkar D, Ferguson M, Datta R, Birnbaum S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbón supplementation, and monitored natural attenuation. *Environ Pollut.* 2005; 136:187-195.
4. Vallejo V, Salgado L, Roldan F. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Rev Colomb Biotecnol.* 2005; 7(2): 67-78.
5. Acuña A, Pucci G, Morales MJ, Pucci O. Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2010; 30:29-36.
6. Monticello DJ. Biotransformation and the upgrading of petroleum distillates. *Curr Op Biotechnol.* 2000; 11(6): 539-546.
7. Riojas HH, Gortáres P, Mondaca I, Balderas JJ, Torres LG. Evaluación de la biorremediación aplicando mezclas de surfactante-solvente en suelo contaminado con diesel. *Rev Latinoam de Recursos Naturales.* 2010; 6(2): 100-109.
8. Salimen J, Tuomi P, Suortti A, Jorgensen K. Potential for aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface. *Biodegradation.* 2004; 15: 29-39.
9. Vera G, Tam J, Pinto E. Efectos ecotoxicológicos del petróleo crudo, diesel 2 y kerosene sobre el crecimiento poblacional de la microalga *Chaetoceros gracilis* Schutt. *Ecol apl.* 2009; 8(1): 1-7.
10. Benavides J, Quintero G, Guevara AL, Jaimes DC, Gutiérrez SM, Miranda J. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova.* 2006; 4(5):82-90.
11. Martín C, González A, Blanco MJ. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev Iberoam Micol.* 2004; 21:103-120.
12. Ferrera R, Rojas NG, Poggi HM, Alarcón A, Cañizares RO. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev Latinoam Microbiol.* 2006; 48(2): 179-187.
13. Pérez RM, Camacho MI, Gómez JM, Ábalos A, Viñas M, Cantero D. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Rev Cenic Cienc Biol.* 2008; 39(1): 44-51.
14. Gómez SE, Gutiérrez DC, Hernández AM, Hernández CZ, Losada M, Mantilla PC. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova* 2008; 6(9): 101-212.
15. Rockne KJ, Chee JC, Sanford RA, Hedlund BP, Staly JT, Strand SE. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(4): 1595-1601.
16. Chen F, Xia Q, Kwang L. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H Fluorescence. *Appl Environ Microbiol.* November 2003; 69(11):6715-6722.
17. Demanéche S, Kay E, Gourbière F, Simonet P. Natural transformation of *Pseudomonas fluorescens* and *Agrobacterium tumefaciens* in soil. *Appl Environ Microbiol.* June 2001; 67(6):2617-2621.
18. Araujo I, Gómez A, Barrera M, Angulo N, Morillo G, Cárdenas C, et al. Surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas contaminadas con crudo liviano. *Interciencia.* 2008; 33(4):245-250.
19. Pérez J, Anaya O, Chang CK, Membrillo Isabel, Calva G. Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno crecidas en hidrocarburos. *Rev Cenic. Ciencias Químicas.* 2010; 41:1-9.
20. Jiménez D, Medina SA, Gracida JN. Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Rev Int Contam Ambient.* 2010; 26(1):65-84.
21. Riojas HH, Moroyoqui PG, Mondaca I, Balderas J. Influencia de los surfactantes en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Rev Facultad de Ciencias Básicas.* 2011; 7(1):94-115.
22. Riojas HH, Torres LG, Mondaca I, Balderas J, Gortáres P. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Rev Química Viva.* Diciembre 2010; 3(9):120-145.
23. Riojas HH, Gortáres P, Mondaca I, Balderas J. Aplicación de Tween 80 y D-Limoneno en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos. *Ideas Concuteg.* 2011; 6(71):571-584.
24. Paria S, Yuet PK. Adsorption of nonionic surfactants onto sand and its importance in naphthalene removal. *Ind Eng Chem* 2007; 46:108-113.
25. Kang SW, Kim YB, Shin JD, Kim EK. Enhanced Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Biosurfactant, Sphorolipid. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 160: 780-790.

26. Beal R, Bettz W. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *Apply Microbiol* 2000; 89:158-168.
27. Cybulski Z, Dziurla E, Kaczorek E, Olszanowski A. The influence of emulsifiers on hydrocarbon Biodegradation by Pseudomonadacea and Bacillacea strains. *Spill Science and technology bolletin*. 2003; 8:505-507.
28. Calvo C, Toledo F, Gonzales J. Surfactant activity of naphtalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *J Biotechnol* 2004; 109: 255-262.
29. Ezeji E, Anyanwu B, Onyeze G, Ibekwe V. Studies on the utilization of Petroleum Hydrocarbon by Micro Organism isolated from oil Contaminated Soil. *Int J Nat Appl Sci* 2005; 1(2): 122-128.
30. Torres LG, Orantes JL, Iturbe R. Biodegradation of Two Nonionic Surfactantss Used for In Situ Flushing of Oil- Contamianted Soils. *Tenside Surfactant Detergents* 2006; 43(5):251-255.
31. Wong JW, Fang M, Zhao Z, Xing B. Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions. *Journaal of Environmental Quality*. 2004; 33:2015-2025.
32. Torres LG, Lemus X, Urquiza G, Verdejo A, Iturbe R. Surfactant enhanced washing of drilling fuilids, a promising remediation technique. *Tenside Surfactant Detergents*. 2005; 42(6):347-355.
33. Youssef NH, Nguyen T, Sabatini DA, Mcinerney MJ. Basis for formulating biosurfactant mixtures to achieve ultra low interfacial tensión values against hydrocarbons. *J Indust Microbiol Biotechnol* 2007; 34: 497-507.
34. Guha S, Jaffé PR. Bioavailability of hydrophobic compounds partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environm Scien & Technol*. 1996; 2:575-580.
35. Nwaogu L, Onyeze G, Nwabueze R. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *African J Biotchnol* 2008; 7(12):1939-1943.

Correspondencia: Heber Robles Castillo. Email: hrobles@unitru.edu.pe
