

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**  
**AMBIENTALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**



**TÍTULO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

**EVALUACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS  
AISLADAS A PARTIR DE UN CONTENEDOR DE ACEITE USADO DE MOTOR**

**PLAN DE TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO/A EN INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTOR/A:**

**KARINA MICHELLE SANTOS CHUÑIR**

**DIRECTOR:**

**Blgo. PEDRO BARBA MSc**

**Ibarra – Ecuador  
2020**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**  
**AMBIENTALES**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

“EVALUACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS  
AISLADAS A PARTIR DE UN CONTENEDOR DE ACEITE USADO DE MOTOR”

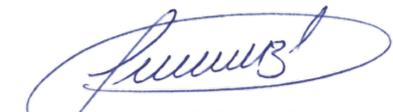
Tesis de Grado revisada por el Comité Asesor; por lo cual, se autoriza su presentación  
como requisito parcial para obtener el Título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

APROBADA:



Blgo. PEDRO BARBA MSc.  
**DIRECTOR**



Ing. SANTIAGO ZARATE MSc.  
**ASESOR**



Ing. JUAN CARLOS GARCÍA PhD.  
**ASESOR**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**

**AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN**  
**A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA**

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

| <b>DATOS DE CONTACTO</b>    |                               |                        |            |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------------|------------|
| <b>CÉDULA DE IDENTIDAD:</b> | 1723820005                    |                        |            |
| <b>APELLIDOS Y NOMBRES:</b> | Santos Chuñir Karina Michelle |                        |            |
| <b>DIRECCIÓN:</b>           | Ibarra, Los Galeanos 1-97     |                        |            |
| <b>EMAIL:</b>               | kmsantosc@utn.edu.ec          |                        |            |
| <b>TELÉFONO FIJO:</b>       |                               | <b>TELÉFONO MÓVIL:</b> | 0960894276 |

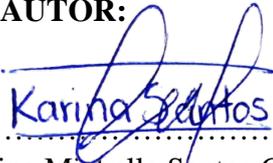
| <b>DATOS DE LA OBRA</b>        |   |
|--------------------------------|---|
| <b>TÍTULO:</b>                 | “EVALUACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS AISLADAS A PARTIR DE UN CONTENEDOR DE ACEITE USADO DE MOTOR” |
| <b>AUTOR (ES):</b>             | Santos Chuñir Karina Michelle   |
| <b>FECHA: DD/MM/AAAA</b>       | 22/08/2020  |
| SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO    |   |
| <b>PROGRAMA:</b>               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PREGRADO</b> <input type="checkbox"/> <b>POSGRADO</b>                        |
| <b>TÍTULO POR EL QUE OPTA:</b> | Ingeniera en Biotecnología  |
| <b>ASESOR /DIRECTOR:</b>       | Blgo. Pedro Barba MSc.  |

## 2. CONSTANCIAS

El autor (es) manifiesta (n) que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que es (son) el (los) titular (es) de los derechos patrimoniales, por lo que asume (n) la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá (n) en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 22 días del mes de agosto de 2020

**EL AUTOR:**



Karina Santos

.....  
Karina Michelle Santos Chuñir

## **PRESENTACIÓN**

Yo, KARINA MICHELLE SANTOS CHUÑIR como autora de la Tesis Titulada **“EVALUACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS AISLADAS A PARTIR DE UN CONTENEDOR DE ACEITE USADO DE MOTOR”**, me hago responsable de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; y pongo este documento como fuente de apoyo para consultas dirigidas a todos los estudiantes.

## AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento especial a la Universidad Técnica del Norte y a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, especialmente a todo el cuerpo docente, administrativo y estudiantil por todo aquello que me enseñaron, ayudaron e inculcaron.

A mi director, magister Pedro Barba por su tiempo y conocimientos impartidos durante la carrera y trabajo de titulación. A mi asesor, magister Santiago Zárate por su apoyo constante, por sus consejos, sus palabras de aliento y el tiempo brindado durante la carrera, fuera del aula y todo el desarrollo del estudio. Al doctor Juan Carlos García, por sus conocimientos y facilidades prestadas para la investigación.

A la doctora María Cristina Echeverría por todas las oportunidades brindadas. A mis colegas y técnicos de laboratorio, Ingenieros Karina Garzón y Adrián Torres por su amistad, consejos y acompañamiento constante dentro y fuera del laboratorio. A mis compañeros tesisistas quienes me brindaron su respaldo y sincera amistad.

A mis amigos y familiares que siempre estuvieron pendientes de mi salud y bienestar. Especialmente a mis padres, quienes fueron los que inculcaron el gusto por el arte y las ciencias.

A la familia Loyo, con gratitud infinita, por su gran corazón, acompañamiento, paciencia y por abrirme las puertas de su hogar.

Al Instituto de Fomento al Talento Humano por el todo el aporte económico para la realización del trabajo de titulación y carrera universitaria.

Karina

## **DEDICATORIA**

A Dios, por encaminarme a una vida y ciudad distinta, por darme salud y la fuerza de voluntad necesarias para cumplir con mis objetivos.

A mis padres Fredy y Rosa por darme la confianza, libertad y apoyo necesarios para crecer en todos los aspectos personales y profesionales, por creer en mí y en mis capacidades. Es para mí una gran satisfacción dedicarles a ellos el trabajo de cinco años que con mucho esfuerzo, perseverancia y sabiduría me lo he ganado.

A mis abuelos, tíos, hermanos y demás familia en general por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, por ser mi sostén de cada día en el transcurso de mi carrera universitaria.

A mis amigos por permitirme aprender cada detalle junto a ellos, por su apoyo, cariño, su honestidad y sincera amistad.

A mis maestros quienes fueron los que me inculcaron el gusto por la ciencia y la investigación.

Karina

## Índice de contenido

|  |    |
|--|----|
| AGRADECIMIENTO .....   | i  |
| DEDICATORIA.....   | ii |
| 1. Índice de figuras .....   | v  |
| 2. Índice de tablas .....  | v  |
| 3. Índice de Anexos .....  | 6  |
| CAPÍTULO I.....  | 9  |
| INTRODUCCIÓN.....  | 9  |
| 1.1 Antecedentes .....   | 9  |
| 1.2 Planteamiento del problema.....                                      | 10 |
| 1.3 Justificación .....  | 11 |
| 1.4 Pregunta directriz.....  | 12 |
| 1.5 Objetivos.....   | 12 |
| 1.5.1 Objetivo general. ....   | 12 |
| 1.5.2 Objetivos específicos .....  | 13 |
| 1.6 Hipótesis .....  | 13 |
| CAPÍTULO II.....   | 14 |
| MARCO TEÓRICO .....  | 14 |
| 2.1 Combustibles fósiles .....   | 14 |
| 2.2 Derivados de los hidrocarburos .....                                 | 14 |
| 2.3 Efectos en el medio ambiente .....                                   | 14 |
| 2.4 Aceite lubricante de motor.....                                      | 15 |
| 2.4.1 Deterioro del aceite lubricante de motor durante su uso .....      | 15 |
| 2.4.2 Destino final y reutilización del aceite lubricante de motor ..... | 16 |
| 2.4.3 Zonas contaminadas con aceites y su tratamiento .....              | 16 |
| 2.5 Microorganismos degradadores de hidrocarburos y sus derivados .....  | 17 |
| 2.5.1 Formas biológicas de degradación de los hidrocarburos.....         | 17 |

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| 2.5.2              | Degradación de aceite usado de motor mediada por bacterias .....                    | 19 |
| 2.6                | Biosurfactantes.....  | 19 |
| CAPÍTULO III ..... |   | 21 |
| METODOLOGÍA.....   |   | 21 |
| 3.1                | Descripción del área de estudio .....   | 21 |
| 3.2                | Obtención de la muestra .....   | 21 |
| 3.3                | Aislamiento de microorganismos .....  | 21 |
| 3.4                | Pruebas de degradación de hidrocarburos .....                                       | 23 |
| 3.4.1              | Prueba de desplazamiento del hidrocarburo para la detección de biosurfactantes..... | 25 |
| 3.4.2              | Prueba de actividad de emulsificación (E <sub>24</sub> ).....                       | 26 |
| 3.5                | Caracterización molecular .....   | 27 |
| 3.6                | Análisis estadístico .....  | 27 |
| CAPÍTULO IV .....  |   | 28 |
| RESULTADOS .....   |   | 28 |
| 4.1                | Aislamiento de microorganismos .....  | 28 |
| 4.2                | Composición de los hidrocarburos .....  | 30 |
| 4.3                | Pruebas de degradación de hidrocarburos .....                                       | 31 |
| 4.3.1              | Prueba de desplazamiento del hidrocarburo.....                                      | 31 |
| 4.3.2              | Prueba de actividad de emulsificación (E <sub>24</sub> ).....                       | 32 |
| 4.4                | Caracterización molecular .....   | 34 |
| CAPÍTULO V .....   |   | 35 |
| DISCUSIÓN.....     |   | 35 |
| 5.1                | Bacterias aisladas .....  | 35 |
| 5.2                | Pruebas de degradación de hidrocarburos .....                                       | 37 |
| 5.2.1              | Prueba de halo de desplazamiento.....   | 37 |
| 5.2.2              | Prueba de emulsificación (E <sub>24</sub> ).....                                    | 38 |

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| CAPÍTULO VI.....                     | 43 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ..... | 43 |
| 6.1 Conclusiones.....                | 43 |
| 6.2 Recomendaciones .....            | 43 |
| REFERENCIAS .....                    | 45 |
| ANEXOS.....                          | 56 |

## 1. Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Resumen esquemático de posibles vías para la utilización de hidrocarburos de petróleo por microorganismos; modificado de Varjani (2017). .....    | 18 |
| Figura 2. Datos de la absorbancia promedio de los tratamientos .....  | 28 |
| Figura 3. Diluciones de la muestra en caldo nutriente a los 5 días del experimento.....   | 29 |
| Figura 4. Microscopía de los aislados a) aislado BR1Pb-3, b) aislado BR1Pb-4, c) aislado DR3Pe-1, .....   | 30 |
| Figura 5. Prueba de halo de desplazamiento en petróleo liviano con el aislado BR1Pb-3 .....   | 31 |
| Figura 6. Promedio del halo de hidrólisis para cada aislado a partir de los sobrenadantes estudiados .....  | 32 |
| Figura 7. Promedio de E <sub>24</sub> para cada sobrenadante de las cepas estudiadas .....  | 33 |
| Figura 8. Prueba de emulsificación en aceite usado con el aislado BR1Pb-3 (A: aceite usado sin emulsionar; B: capa de emulsificación; C: sobrenadante)..... | 33 |

## 2. Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Enzimas involucradas en la degradación de los hidrocarburos de petróleo ....                  | 18 |
| Tabla 2. Tratamientos en el experimento de evaluación del crecimiento .....                            | 22 |
| Tabla 3. Esquema del análisis de la varianza para la evaluación de la absorbancia .....                | 22 |
| Tabla 4. Composición química del medio de cultivo MSM.....   | 24 |
| Tabla 5. Tratamientos para los ensayos de degradación de hidrocarburo .....                            | 25 |
| Tabla 6. Esquema del análisis de los ensayos de desplazamiento de hidrocarburo y E <sub>24</sub> ..... | 27 |

|   |    |
|---|----|
| Tabla 7. Composición elemental de los hidrocarburos.....                  | 31 |
| Tabla 8. Resultados de la caracterización molecular de los aislados ..... | 34 |

### 3. Índice de Anexos

|   |    |
|---|----|
| Anexo 1. Ubicación del sitio de muestreo .....  | 56 |
| Anexo 2. Datos de la medida de la absorbancia de los cultivos.....  | 57 |
| Anexo 3. Datos del número de UFC de los cultivos .....  | 57 |
| Anexo 4. Pruebas de normalidad para la absorbancia .....  | 57 |
| Anexo 5. Análisis de la varianza para la absorbancia de los cultivos .....  | 57 |
| Anexo 6. Resultados de la prueba de Tukey para la absorbancia.....  | 58 |
| Anexo 7. Datos de la prueba de desplazamiento .....   | 58 |
| Anexo 8. Datos de las medias de la prueba de desplazamiento .....   | 58 |
| Anexo 9. Datos de la prueba de emulsificación .....   | 58 |
| Anexo 10. Datos de las medias de la prueba de emulsificación.....   | 59 |
| Anexo 11. Pruebas de normalidad para la prueba de desplazamiento.....   | 59 |
| Anexo 12. Pruebas de normalidad para la prueba del porcentaje de emulsificación (E <sub>24</sub> )<br>.....   | 59 |
| Anexo 13. Análisis de la varianza para ambas pruebas de degradación de hidrocarburo<br>(Prueba de desplazamiento y Porcentaje de emulsificación E <sub>24</sub> ) ..... | 60 |
| Anexo 14. Resultados de la prueba de Tukey para la prueba de desplazamiento .....   | 60 |
| Anexo 15. Resultados de la prueba de Tukey para la prueba de porcentaje de<br>emulsificación E <sub>24</sub> .....  | 61 |
| Anexo 16. Correlación de las pruebas de degradación.....  | 61 |
| Anexo 17. Observación de los amplicones obtenidos de la PCR del marcador molecular<br>16s en gel de electroforesis al 2% .....  | 62 |

## RESUMEN

El problema ambiental generado por los hidrocarburos y sus derivados, especialmente por el destino final de estos, ha sido un tema de interés a lo largo de los años. Es así que se han desarrollado técnicas para su disposición final y para la remediación de las zonas contaminadas con estos. Una de las alternativas para tratar dichas zonas es la biorremediación utilizando organismos vivos propios de dichas zonas. Las bacterias han sido uno de los microorganismos más utilizados en estos procesos debido a su capacidad de degradar compuestos de los hidrocarburos e incluirlos en su metabolismo. En la presente investigación se evaluó la capacidad degradativa de hidrocarburos de bacterias aisladas a partir de un contenedor de aceite usado de motor. Se realizaron las pruebas de desplazamiento y emulsificación de hidrocarburos. Una vez comprobada su actividad degradativa se caracterizó molecularmente a los aislados. Las pruebas realizadas confirmaron que las bacterias producen un tipo de surfactante puesto que en todos los aislados hubo desplazamiento. Todas las bacterias presentaron la capacidad de emulsionar los hidrocarburos, aunque no en el mismo porcentaje. Al realizar la identificación molecular de los aislados, se encontró que todos pertenecían al género *Bacillus*. Los compuestos excretados por estos microorganismos podrían ser explotados y aplicados a futuro en procesos de biorremediación *in situ* y *ex situ*.

**Palabras clave:** bacterias, aceite usado, degradación, hidrocarburos, *Bacillus*.

## ABSTRACT

The environmental problem generated by hydrocarbons and their derivatives, especially by their final destination, has been a topic of interest over the years. Thus, techniques have been developed for their final disposal and for the remediation of areas contaminated with these. One of the alternatives to treat these areas is bioremediation using living organisms from these areas. Bacteria have been one of the most widely used microorganisms in these processes due to their ability to degrade hydrocarbon compounds and include them in their metabolism. In the present investigation, the degradative capacity of hydrocarbons of bacteria isolated from a container of used motor oil was evaluated. Hydrocarbon displacement and emulsification tests were carried out. Once their degradative activity was verified, the isolates were molecularly characterized. The tests carried out confirmed that the bacteria produce a type of surfactant since in all the isolates there was displacement. All bacteria had the ability to emulsify hydrocarbons, although not in the same percentage. When carrying out the molecular identification of the isolates, it was found that all belonged to the genus *Bacillus*. The compounds excreted by these microorganisms could be exploited and applied in the future in *in situ* and *ex situ* bioremediation processes.

**Keywords:** bacteria, used oil, degradation, hydrocarbons, *Bacillus*.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

Los derrames de petróleo son una importante fuente de contaminación tanto de suelo como de agua (Acosta-Rodríguez et al., 2011). Es así como los hidrocarburos del petróleo y sus derivados están entre las clases más importantes de contaminantes orgánicos en el medio ambiente (Liporace et al., 2018). El tratamiento de zonas contaminadas con hidrocarburos y sus derivados ha requerido de la intervención de sustancias químicas para su reutilización o descontaminación que no son totalmente amigables con el ambiente (Neilson, Artiola, y Maier, 2003). A manera de solución, la utilización de productos de origen biológico ofrece una nueva alternativa amigable con el medio ambiente pues no generan derivados que contienen toxicidad (Giraldo et al., 2014).

En la nueva era de la industrialización global, la biotecnología representa una alternativa viable para el desarrollo industrial sustentable ya que provee las herramientas necesarias para mejorar el quehacer industrial (Banat et al., 2000; Oliart-Ros, Manresa-Presas y Sánchez-Otero, 2016). De tal forma se la ha utilizado en diversos procesos aplicados al desarrollo de productos en la industria medicinal, alimentaria, energética y demás (Oliart-Ros et al., 2016). En este entorno, se puede utilizar a la biotecnología para aprovechar sitios contaminados con petróleo en tanto que pueden albergar microorganismos útiles para diversos procesos, entre ellos la biorremediación (Kadali et al., 2012). En consecuencia, se podría reducir el riesgo asociado con la contaminación por hidrocarburos al aprovechar dichos microorganismos (Suja et al., 2014).

Los microorganismos al ser diversos genética y metabólicamente, pueden estar presentes en cualquier nicho ecológico y adaptarse rápidamente a diferentes condiciones ambientales (Oliart-Ros et al., 2016). Es así que, microorganismos propios de zonas contaminadas han desarrollado tolerancia a ciertos componentes y los han incluido en su metabolismo (Acosta-Rodríguez et al., 2011). Rampelotto (2013) menciona que se han investigado diversidad de organismos de distintos géneros tales como *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, entre otros, que habitan en ambientes extremos como sitios contaminados (Yu y Huang, 2011; Ron y Rosenberg, 2014). Dichos

organismos conocidos como extremófilos prosperan en hábitats que para otras formas de vida terrestres son hostiles o incluso letales (Oliart-Ros et al., 2016).

El-Bestawy, El-Masry, y El-Adl (2005) identificaron varios microorganismos aislados de aceite vegetal y aguas residuales industriales contaminadas con grasas, los cuales poseían potencial degradador de estas, especialmente del aceite de palma. Por otro lado, microorganismos pertenecientes a géneros como *Arthrobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Bacillus*, etc. han sido aislados de zonas contaminadas con hidrocarburos, además de haber presentado capacidad degradativa de aceites lubricantes residuales (Yu y Huang, 2011; Ron y Rosenberg, 2014). Sin embargo, existe diversidad de estudios que se han enfocado en el género *Pseudomonas* por presentar gran potencial para la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos (Mansur et al., 2014; Otálora et al., 2000; Saikia y Deka, 2013).

## **1.2 Planteamiento del problema**

La contaminación ambiental causada por el petróleo y sus derivados tiene un impacto creciente en la restauración ecológica y el desarrollo económico (Su et al., 2011). Las actividades de producción, transporte y refinamiento de aceite crudo liberan hidrocarburos en ambientes terrestres y acuáticos (Sarma y Sarma, 2010) por lo que ha sido reconocida como una de las problemáticas más graves, especialmente por derrames accidentales de gran escala (Udeani et al., 2009).

La alta demanda del petróleo y sus subproductos (gasolina, diésel y aceites lubricantes), ha llevado al aumento de la contaminación en todo el mundo (Ismail et al., 2014). Los usuarios más grandes de los derivados del petróleo son la industria automotriz y de maquinaria. Uno de los productos más utilizados por estas industrias es el aceite lubricante de motor, el cual es usado y desechado con frecuencia (Abioye et al., 2012). Es así que en el estudio de Ibrahim (2016) se menciona que en el Oriente Medio mil millones de galones de aceite lubricante de desecho es generado anualmente durante los procesos de cambio en los talleres automotrices y mecánicos.

Para dar respuesta a esta problemática, se han desarrollado diferentes metodologías que pueden aplicarse a este tipo de residuos. Los tratamientos más comúnmente usados son la disposición en lugares considerados seguros, métodos de incineración, tratamientos químicos y tratamientos biológicos (Pucci et al., 2015). Sin

embargo, tienen limitaciones como los altos costos de implementación a gran escala, no son amigables con el medio ambiente, son complejas y conducen a la destrucción del ambiente (Khan et al., 2004; Zhang et al., 2009).

Los procesos biológicos de tratamiento son también conocidos como biorremediación y plantean la remediación de sitios contaminados mediante la adición de microorganismos específicos o la mejora de los preexistentes en el sitio (Lee, Mats, Delfino, Suresh, y Raot, 1992). Esta técnica ha demostrado ser efectiva para la mayoría de los medios contaminados como aguas subterráneas, aguas residuales y lodos sólidos y aceitosos (Suja et al., 2014). Preferiblemente, se usa cepas locales por estar bien adaptadas para propagarse en procesos de biorremediación (Suja et al., 2014). Sin embargo, cada cepa se caracteriza por utilizar solo algunos tipos de hidrocarburos (Su et al., 2011).

Varios estudios han utilizado cepas de bacterias como *Acinetobacter* sp. (Kubota, Koma, Matsumiya, Chung, y Kubo, 2008), *Pseudomonas aeruginosa* (Haba et al., 2000), *Pseudomonas putrefaciens* (Ismail et al., 2014), *Rhodococcus* sp. (Hassanshahian, et al., 2012), así como otras especies del género *Pseudomonas* sp. (Reyes-Reyes et al., 2018) *Klebsiella pneumonia* (Ismail et al., 2014), *Bacillus subtilis* (Mukherjee y Bordoloi, 2011), *Serratia marcescens* (Wongsa et al., 2004), entre otras que han presentado capacidad para degradar hidrocarburos. No obstante, los estudios realizados a nivel nacional en este campo son escasos y existe información insuficiente acerca de bacterias que hayan sido aisladas directamente de los contaminantes y que presenten capacidad degradadora de estos.

### **1.3 Justificación**

A raíz del problema ambiental causado por la contaminación por hidrocarburos y sus derivados, se han buscado soluciones para disminuir o mitigar el impacto que generan en el entorno. En estudios previos, se ha utilizado material biológico para remover estos contaminantes de aguas y suelos, siendo las bacterias los organismos más estudiados en estos procesos (El-Bestawy et al., 2005; Hua et al, 2004; Husaini et al, 2008; Mukherjee y Bordoloi, 2011; Pi et al., 2017; Pucci et al., 2015; Rosenberg, 1993; Su et al., 2011; Yuan et al., 2018).

Las bacterias son los microorganismos que han presentado mejor eficiencia en cuanto a la degradación de hidrocarburos (El-Bestawy et al., 2005; Karamalidis et al.,

2010; Li et al., 2016; Tao et al., 2017), especialmente las especies del género *Pseudomonas* que han sido una de las más investigadas con este fin (Abalos et al., 2004; Arutchelvi y Doble, 2010; Karamalidis et al., 2010; Saikia et al., 2012; Su et al., 2011; Wadekar et al., 2012). Sin embargo, no son el único género de bacterias que puede degradar dichos contaminantes (Cameotra y Makkar, 1998; Huang et al., 2008; Ibrahim, 2016; Najafi et al., 2010).

Se ha utilizado distintas metodologías para aislar estas bacterias, al igual que distintas pruebas para evaluar su capacidad degradativa (Hii et al., 2009; Mukherjee y Bordoloi, 2011; Patowary et al., 2016; Udeani et al., 2009; Zhang et al., 2012). También, se han probado distintas fuentes de carbono tales como petróleo, aceite desgastado de cocina, incluso combustible diésel (Koma et al., 2003; Sarma, et al., 2010; Wadekar et al., 2012; Wongsu et al., 2004) con el objetivo de estudiar las diferentes formas en que las bacterias metabolizan estas fuentes de carbono y las hacen más asimilables. Pese a esto, un número reducido de esta clase de estudios se han realizado en Latinoamérica. Ecuador es un lugar donde la biorremediación es un campo incipiente.

La presente investigación se realiza con la finalidad de aislar bacterias de un contenedor de aceite usado de motor y a la vez comprobar la capacidad degradativa de hidrocarburos de éstas. La relevancia del estudio radica en aportar con información para encontrar una posible solución a la problemática de la contaminación por hidrocarburos, especialmente a nivel nacional, así como también, abrir paso a nuevas investigaciones que generen tecnologías de biorremediación.

#### **1.4 Pregunta directriz**

¿Las bacterias aisladas a partir de aceite usado de motor poseen capacidad degradativa de hidrocarburos?

#### **1.5 Objetivos**

##### **1.5.1 Objetivo general.**

Evaluar la capacidad degradativa de hidrocarburos de microorganismos aislados de un contenedor de aceite usado de motor.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

- Aislar microorganismos de un contenedor de aceite usado de motor
- Evaluar la capacidad degradativa de hidrocarburos de los microorganismos aislados
- Identificar molecularmente a los microorganismos aislados

### **1.6 Hipótesis**

Bacterias aisladas a partir de aceite usado de motor tienen la capacidad de degradar hidrocarburos.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Combustibles fósiles**

Los hidrocarburos de petróleo se utilizan como fuente primaria para la generación de energía, la industria y el transporte en la vida diaria (Mohanram, Jagtap, y Kumar, 2016). Debido a la creciente demanda energética en todo el mundo, la exploración de nuevos campos petroleros ha aumentado (Mapelli et al., 2017) gracias a que son la fuente energética más rentable en la economía global actual (Kadri, Magdouli, Rouissi, y Brar, 2018).

El petróleo se produce por descomposición térmica de material orgánico enterrado durante millones de años (Varjani, 2017). Es una mezcla compleja de hidrocarburos que van desde alcanos de cadena lineal simples hasta hidrocarburos poliaromáticos complejos (PHA) (Li et al., 2016; Mansur et al., 2014). Sin embargo, existen muchas amenazas en el medio ambiente cuando se utilizan como fuentes de energía (Al-Hawash et al., 2018), debido a que son propensos a la transformación y mineralización (Zhang et al., 2012).

#### **2.2 Derivados de los hidrocarburos**

La transformación del petróleo en productos de consumo directo implica una serie de operaciones y procesos de índole física y química de elevada complejidad y considerables costos de inversión y mantenimiento (Alvarado et al., 2015). El petróleo crudo se procesa en el refinador y se transforma en una amplia gama de productos útiles, como diésel, gasolina, aceites lubricantes, solventes químicos, nafta de petróleo, combustible para aviones, materias primas petroquímicas, queroseno, asfalto, ceras, entre otros (Mansur et al., 2014; Varjani y Upasani, 2017).

#### **2.3 Efectos en el medio ambiente**

Una gran cantidad de estos residuos se elimina ilegalmente, lo que puede causar graves problemas ambientales (Chin, Shafiq, y Nuruddin, 2012). El gobierno, la industria y el público ahora reconocen los peligros potenciales que los hidrocarburos totales de petróleo (TPH), los policlorobifenilos (PCB) o, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHA) pues representan un peligro potencial para la salud humana y el medio ambiente

(Khan et al., 2004). Por lo tanto, su persistencia en el medio ambiente es motivo de gran preocupación para la sociedad (Brzeszcz y Kaszycki, 2018).

La liberación de componentes de petróleo al medio ambiente puede contaminar el agua subterránea con plomo, magnesio, cobre, zinc, cromo, arsénico, cloruros, cadmio y bifenilos policlorados (Chin et al., 2012). Esto resulta en un cambio inmediato en la estructura de la comunidad bacteriana (Tang et al., 2010). En este aspecto, Abdulsalam et al. (2011) mencionan, que a nivel mundial, los talleres de mecánica automotriz contribuyen a la contaminación del suelo, pues contaminan un porcentaje mayor de tierra en el mundo; al comparar con derrames catastróficos, gracias a los productos que utilizan a diario.

## **2.4 Aceite lubricante de motor**

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) (2001) definió el aceite usado de motor como aceite sintético o a base de petróleo que se ha utilizado para la lubricación de vehículos. El aceite de motor se obtiene mediante el refinado de petróleo crudo (Bagherzadeh-Namazi et al., 2008). Principalmente, consiste en hidrocarburos saturados de cadena larga con alto punto de ebullición (Bhurgri et al., 2018).

### **2.4.1 Deterioro del aceite lubricante de motor durante su uso**

El aceite lubricante obtenido después del servicio y posterior drenaje de automóviles, generadores y máquinas industriales se elimina indiscriminadamente en todo el mundo (Bhattacharya et al., 2015). Durante su uso, el aceite se somete a algunos procesos de degradación por oxidación, contaminación y agotamiento del aditivo (Stan et al., 2018). Como resultado, el aceite de motor se impurifica con suciedad, agua, productos químicos o metales del motor del vehículo (EPA, 2001).

Al deteriorarse, su contenido se modifica a sustancias tóxicas; tales como benceno, plomo, arsénico, zinc y cadmio, hidrocarburos poliaromáticos (PHAs), hidrocarburos clorados (PCB) y otros contaminantes de hidrocarburos que pueden filtrarse en la capa freática y contaminar el agua subterránea, además de que tienen efectos cancerígenos y neurotóxicos en sistemas biológicos (Abdulsalam et al., 2011; Bhattacharya et al., 2015). En un solo cambio de 1 L de aceite se puede contaminar hasta

3.784 m<sup>2</sup> de suelo o arruinar un millón de galones de agua dulce, que es suficiente para el suministro de un año para 50 personas (Chin et al., 2012).

#### **2.4.2 Destino final y reutilización del aceite lubricante de motor**

Los aceites usados se pueden volver a refinar al aceite lubricante base mediante un proceso de reciclaje adecuado (Bhattacharya et al., 2015). Sin embargo, seguiría siendo un contaminante potencial. En Ecuador, no existe información precisa del manejo de desechos líquidos peligrosos generados por la industria automotriz, menos aún de su reutilización, pues tan sólo 21,25% de las empresas registradas conocen la cantidad de aceites usados que generan en su funcionamiento (INEC, 2016).

En Imbabura, la empresa que se encarga del co-procesamiento de aceites minerales usados o gastados, material adsorbente contaminado con hidrocarburos, lodos de aceite, lodos de tanques de almacenamiento de hidrocarburos, grasas y ceras usadas es ACERIA DEL ECUADOR C.A. ADELCA (MAE, 2016). No obstante, no existe información clara de los procesos que se utilizan en cuanto al aceite usado que sale de los talleres automotrices.

#### **2.4.3 Zonas contaminadas con aceites y su tratamiento**

Se han desarrollado una serie de métodos físicos (Mapelli et al., 2017) para disponer de forma final de los derivados de hidrocarburos. Estas tecnologías incluyen: tratamiento térmico, método de excavación y descarga, método químico, técnicas de separación y tecnología de estabilización/solidificación (Abdulsalam et al., 2011). Además de los procesos fisicoquímicos, existen otras alternativas para remediar o recuperar zonas contaminadas con estos desechos como es la biorremediación (Hii et al., 2009).

La biorremediación es el proceso natural por el cual los microorganismos transforman los contaminantes ambientales en productos finales inofensivos (Abdulsalam et al., 2011; Wu et al., 2016). El tratamiento biológico, basado en la capacidad de los microorganismos para degradar los contaminantes de hidrocarburos ha sido utilizado en los últimos años, como una técnica frecuente, eficiente y económica que convierte los desechos tóxicos en productos finales no tóxicos (Mansur et al., 2014; Ghoreishi et al., 2017).

La degradación de estos contaminantes mediante el uso de microorganismos se presenta como una alternativa a los métodos tradicionales de reutilización o eliminación. Aunque, su actividad puede verse afectada por factores bióticos y abióticos tales como temperatura, oxígeno, pH y nutrientes (Al-Hawash et al., 2018). Además de que se han descrito un número limitado de cepas microbianas que son capaces de biodegradar todos los componentes del petróleo crudo (Shetaia et al., 2016).

## **2.5 Microorganismos degradadores de hidrocarburos y sus derivados**

Microorganismos como bacterias, levaduras y hongos secretan metabolitos en sustratos hidrófobos que los hace aprovechables para el crecimiento de las células (Haba et al., 2000). Algunas bacterias tienen la habilidad de degradar aceite de motor de forma eficiente una vez que hayan crecido en un medio en el que los contaminantes son la única fuente de carbono (Ibrahim, 2016). Varios estudios se han enfocado en distintas cepas bacterianas para procesos de degradación de hidrocarburos y sus derivados debido al potencial que poseen (Crisafi et al., 2016; Díaz De Rienzo et al., 2016; Yuan et al., 2018).

Cepas de los géneros bacterianos *Pseudomonas* sp. (Echeverriet al., 2010; Saikia y Deka, 2013; Sarkar et al., 2017), *Rhodococcus* sp. (Pucci et al., 2015; Wolińska et al., 2016), *Micrococcus* sp. (Rahman et al., 2002; Torres et al., 2005), *Bacillus* sp. (Barros et al., 2008; Liu et al., 2016; Patowary et al., 2016), *Arthrobacter* sp. (Arrieta et al., 2012; Mansur et al., 2014), *Acinetobacter* sp. (Matsui et al., 2014; Mohanram et al., 2016; Muthukamalam et al., 2017), entre otros, se han aislado de distintas zonas contaminadas con hidrocarburos o alguno de sus derivados y en ensayos de degradación de contaminantes han presentado resultados positivos.

### **2.5.1 Formas biológicas de degradación de los hidrocarburos**

Dependiendo de la longitud de la cadena y el tipo de contaminantes de hidrocarburos de petróleo, se requiere diferentes enzimas para introducir oxígeno en el sustrato y así comenzar la biodegradación (Varjani, 2017). Según Atlas (1981) y Leahy y Colwell (1990) la biodegradabilidad de los hidrocarburos se puede clasificar en el siguiente orden de degradación: alcanos lineales, alcanos ramificados, alquilaromáticos de bajo peso molecular, monoaromáticos, alcanos cíclicos y por último asfaltenos poliaromáticos.

Hay tres formas posibles de utilización de hidrocarburos de petróleo: (a) fototróficas, anoxigénicas; (b) quimiotrófico, aeróbico; y (c) quimiotrófico, anaeróbico (Varjani, 2017) que se resumen en la Figura 1.

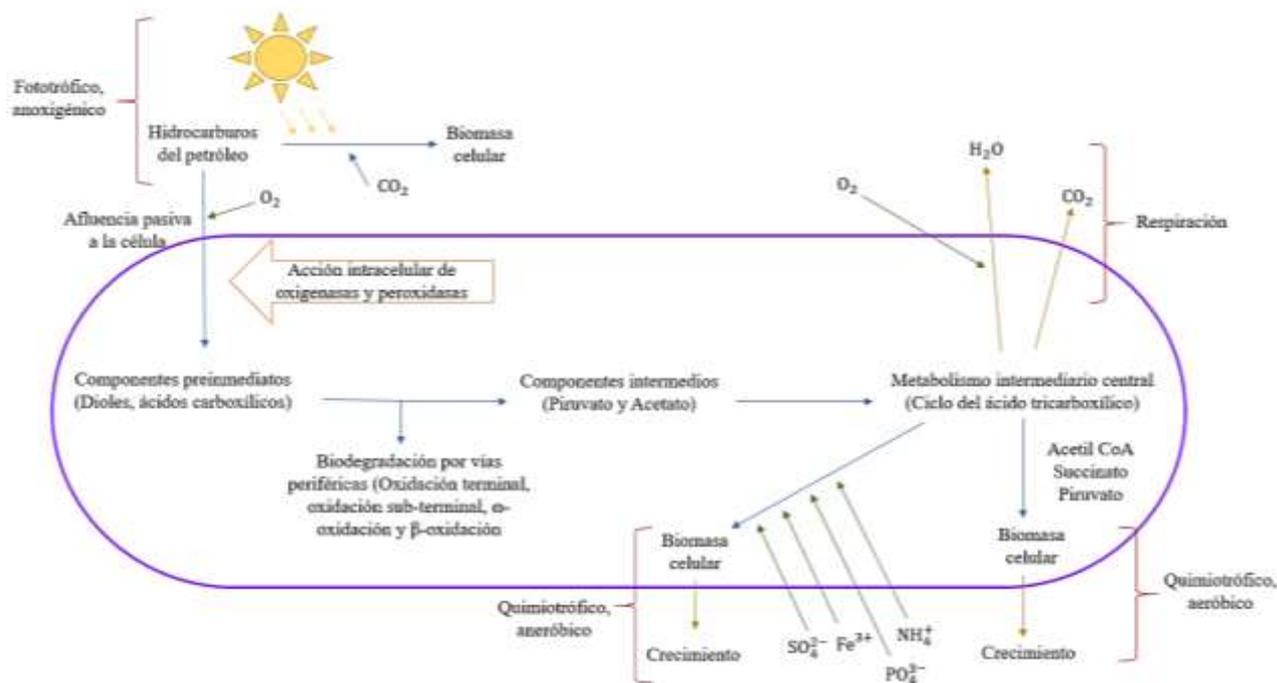


Figura 1. Resumen esquemático de posibles vías para la utilización de hidrocarburos de petróleo por microorganismos; modificado de Varjani (2017).

Adicionalmente se sabe que para poder degradar los distintos componentes de los hidrocarburos de petróleo intervienen ciertas enzimas (Tabla 1) que son producidas por varios microorganismos.

Tabla 1.

*Enzimas involucradas en la degradación de los hidrocarburos de petróleo*

| Enzima  | Compuesto  | Microorganismo  |
|---|--|---|
| Metano monooxigenasas solubles/particuladas                       | Alcanos C1-C8, C1-C5 (halogenados) alcanos, alquenos, cicloalcanos | <i>Methylocystis</i> sp.,<br><i>Methylomonas</i> sp.,<br><i>Methylocella</i> sp.,<br><i>Methylobacter</i> sp.,<br><i>Methylococcus</i> sp.,<br><i>Geobacillus hermodenitrificans</i> ,<br><i>Methylomirabilis oxyfera</i> |
| AlkB relacionados con alcano hidroxilasas eucariotas P450 (CYP52) | Alcanos C5-C16, alquilbencenos, Cicloalcanos, ácidos grasos        | <i>Pseudomonas</i> sp.,<br><i>Burkholderia</i> sp.,<br><i>Rhodococcus</i> sp.,<br><i>Mycobacterium</i> sp.,<br><i>Candida maltosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>                            |
| Sistema de oxigenasa bacteriana P450 (CY153)                      | Alcanos C5-C16, cicloalcanos                                       | <i>Acinetobacter</i> sp.,<br><i>Caulobacter</i> sp.,<br><i>Mycobacterium</i> sp.  |
| Dioxigenasas  | Alcanos C10-C30  | <i>Acinetobacter</i> sp.  |

### **2.5.2 Degradación de aceite usado de motor mediada por bacterias**

La degradación rápida y completa de la mayoría de los contaminantes orgánicos ocurre en condiciones aeróbicas, sin embargo, la actividad de los microbianos puede verse afectada por factores como temperatura (de 15-40 °C, dependiendo si es en suelos o en aguas), oxígeno (dependiendo del compuesto puede ser en condiciones aerobias o anaerobias), pH (neutro, aunque dependiendo de la zona de donde fue aislada la bacteria, puede variar desde 2.5-11) y nutrientes (Al-Hawash et al., 2018). Varias bacterias producen metabolitos extracelulares que poseen distintas características y que cumplen diferentes funciones (Cameotra y Makkar, 1998). En el caso de los hidrocarburos, para que las bacterias puedan metabolizar y utilizar estos compuestos como fuente de carbono, producen moléculas anfipáticas o más conocidos como biosurfactantes (Saikia et al., 2012).

### **2.6 Biosurfactantes**

Los surfactantes son moléculas que tienen una facción hidrofílica y otra hidrofóbica; algunos microorganismos crean sus propios surfactantes a los cuales se les denomina biosurfactantes (Deshpande et al, 1999; Liu et al., 2004). Los biosurfactantes aislados comúnmente son glucolípidos y lipopéptidos (Najafi et al., 2010). Estos compuestos tienen la particularidad de mantenerse en dos interfases; la parte hidrofóbica de la molécula se basa en ácidos grasos de cadena larga, ácidos grasos hidroxilados o ácidos grasos  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxilados; la porción hidrofílica puede ser un carbohidrato, aminoácido, péptido cíclico, fosfato, ácido carboxílico o alcohol (Mulligan, 2005). Su potencial acción es su capacidad de emulsión, desorción y solubilidad (Riojas, Torres, Mondaca, Balderas, & Gortáres, 2010).

Pueden mejorar la biodisponibilidad de los contaminantes de dos formas: a) aumentando la velocidad de dilución mediante la separación de los hidrocarburos por las micelias de la molécula y b) interaccionando con la superficie del sustrato influyendo en el proceso de dilución (Volkering et al., 1997). Algunas bacterias producen también biosurfactantes-emulsificantes para reducir la tensión superficial y crear nuevas interfaces (Mohanram et al., 2016). Los biosurfactantes secretados por bacterias son más efectivos que los tensioactivos químicos para mejorar la solubilidad y la degradación de los hidrocarburos de petróleo (Cybulski et al., 2003). Algunos biosurfactantes producidos por

las bacterias pueden emulsionar las mezclas de hidrocarburos con agua y así mejorar la degradación de los contaminantes en el ambiente (Banat, Makkar, y Cameotra, 2000; Pérez et al. 2008). Es así que aumentan la biodisponibilidad de los hidrocarburos mediante la emulsión (Verma, Bhargava, & Pruthi, 2006).

Estos metabolitos crean una micro-emulsión en la que los hidrocarburos se hacen solubles en agua o viceversa gracias a sus partes hidrofóbica e hidrofílica (Banat, 1995). Al reducirse la tensión superficial de los contaminantes es posible la dispersión del mismo en emulsiones (Torres et al., 2005). La emulsificación de los surfactantes puede incrementar la actividad enzimática o facilitar el transporte del sustrato orgánico hacia las células (Hadibarata y Tachibana, 2009), con lo cual, la degradación de los contaminantes podría ser posible mediante un sistema enzimático específico para cada hidrocarburo y especie bacteriana, dependiendo del tipo de surfactante que produzca y su forma de acción (Al-Hawash et al., 2018).

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

En el presente capítulo se detallan los métodos utilizados para el aislamiento de los microorganismos, evaluación del crecimiento, pruebas de degradación y caracterización molecular de los aislados.

#### **3.1 Descripción del área de estudio**

El presente proyecto de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Técnica del Norte, ubicado en la parroquia El Sagrario, cantón Ibarra, provincia de Imbabura, Ecuador.

#### **3.2 Obtención de la muestra**

La mecánica automotriz para el muestreo fue seleccionada debido a que cumplía con las especificaciones y licencias ambientales para su funcionamiento (adecuación de espacios, rotulación adecuada, especificaciones de su funcionamiento, planes de manejo ambiental, documentos y registros). Para mantener la homogeneidad del experimento, se recolectó una única muestra de 200 ml de aceite usado de motor, almacenado durante 15 días en contenedores de una mecánica automotriz de la ciudad de Ibarra. La muestra se encontraba en condiciones anóxicas y sin exposición a la luz. Se tomó la muestra utilizando una bomba de distribución extrayendo la alícuota de 200 ml de aceite del fondo de los tanques, en condiciones estériles, para luego ser colocada en un frasco ámbar de vidrio de 250 ml. La utilización de estos frascos fue debido a que los compuestos del aceite son fotolábiles. Una vez colectada, la muestra fue transportada hacia el laboratorio manteniendo una temperatura de 4°C (Ibrahim, 2016).

#### **3.3 Aislamiento de microorganismos**

Este ensayo consistió en diluir 1 ml de muestra (aceite usado de motor) en 9 ml Caldo Nutriente (Difco™ BD) de obteniendo así las siguientes diluciones: 0.1; 0.01; 0.001 y 0.0001 ( $\mu$ l/ml). Estas se mantuvieron a 29°C y 150 rpm en una incubadora orbital en ausencia de luz (SCI FINETECH Co) (Arutchelvi y Doble, 2010; Karamalidis et al., 2010; Najafi et al., 2010; Abioye et al., 2012; Saikia et al., 2012; Patowary et al., 2016).

Para este ensayo se diseñó un experimento con cuatro tratamientos (Tabla 2). El factor en estudio evaluado fue la concentración de microorganismos en la muestra. La variable de respuesta evaluada fue la absorbancia (600 nm) que se midió cada 24 horas, durante 5 días, utilizando un espectrofotómetro (Jenway 6705 UV/Vis). La unidad experimental para la evaluación fue 1 ml de muestra de caldo nutriente.

Tabla 2.

*Tratamientos en el experimento de evaluación del crecimiento*

| <b>Tratamiento</b> | <b>Código</b> | <b>Dilución (µl/ml)</b> |
|--------------------|---------------|-------------------------|
| T1                 | C1            | 0.1                     |
| T2                 | C2            | 0.01                    |
| T3                 | C3            | 0.001                   |
| T4                 | C4            | 0.0001                  |

Se realizaron tres repeticiones de cada uno de los tratamientos. De tal manera que se obtuvieron doce unidades experimentales. Valores superiores a 0.1 ul/ml fueron diluidos una vez para mejorar la sensibilidad del ensayo. Adicionalmente, se realizó el conteo en placa de las unidades formadoras de colonia (UFC) para comparar con los resultados de absorbancia, cultivando 100 µL de cada solución en Agar Nutriente (NEOGEN) (Muthukamalam et al., 2017).

Con el fin de determinar diferencias entre los tratamientos, y conocer la viabilidad de los cultivos, se realizó un Análisis de la varianza (ANOVA) ajustado a un modelo de diseño de bloques completos al azar (DBCA) (Tabla 3). Para cumplir con los supuestos de la estadística paramétrica se realizó una transformación raíz cuadrada. Se aplicó pruebas de significancia estadística, utilizando la prueba de Tukey con 5% de significancia, en todas las fuentes de variación que resultaron significativas después de la realización del ANOVA.

Tabla 3.

*Esquema del análisis de la varianza para la evaluación de la absorbancia*

| <b>Fuentes de variación</b> | <b>GI</b> |
|-----------------------------|-----------|
| Total                       | 11        |
| Tratamientos                | 3         |
| Repetición                  | 2         |
| Error experimental          | 6         |

Las UFC encontradas durante los cinco días de evaluación, se inocularon en Agar Pseudomonas (Difco<sup>TM</sup> BD) con la finalidad de obtener cultivos puros de este grupo taxonómico, debido a la evidencia de la capacidad degradativa de hidrocarburos que han demostrado (Mukherjee y Bordoloi, 2011; Narváz Flórez et al., 2016; Pucci et al., 2015; Sajna et al., 2015; Díaz De Rienzo et al., 2016).

Las características morfológicas de los aislados se estudiaron mediante tinción de Gram (Varjani y Upasani, 2016). A lo largo de esta etapa de la investigación, se realizaron varias resiembras en Agar Pseudomonas hasta obtener un cultivo puro (Azeredo, Sillankorva, y Pires, 2014). Se seleccionaron aquellos cultivos que presentaron mayor crecimiento en Agar Pseudomonas a las 24 horas de haber sido inoculados para proceder con los ensayos posteriores.

### **3.4 Pruebas de degradación de hidrocarburos**

Para los ensayos de la capacidad degradativa de los aislados, se utilizó la metodología descrita por Wongsá et al. (2004) con modificaciones pues él únicamente utilizó combustible diésel para este experimento. Se utilizaron, además del aceite usado de motor, tres distintos hidrocarburos: diésel, aceite de motor nuevo sin uso y petróleo liviano, de los cuales se recolectaron 200 ml de cada uno. Adicionalmente, se tomó 20 ml de cada hidrocarburo para realizar un análisis elemental (porcentaje de Nitrógeno, Carbono y Azufre) y así relacionarlos con los resultados obtenidos. Los análisis de la composición de cada hidrocarburo se realizaron en los laboratorios de Ingeniería Química de la Universidad Central del Ecuador.

Las pruebas de degradación de hidrocarburos que se realizaron fueron: la prueba de halo de desplazamiento y el porcentaje de emulsificación (E<sub>24</sub>). Para las pruebas de degradación de hidrocarburos se utilizó Caldo Nutriente para el crecimiento bacteriano y el Medio de Sales Minerales (MSM) para la conservación de los precipitados bacterianos (sedimento celular bacteriano) obtenidos del Caldo Nutriente (Ebadi et al., 2017; Yuan et al., 2018; Zhang et al., 2012). La composición del MSM se detalla en la Tabla 4. Posteriormente, basándose en Ibrahim (2016), con siguientes modificaciones, se inoculó una colonia individual de cada aislado en matraces de 250 ml con 25 ml de caldo nutriente y se incubó en agitación a 29°C y 150 rpm durante 24 h.

Tabla 4.

*Composición química del medio de cultivo MSM*

| <b>Nombre de la sal</b>       | <b>Compuesto</b>                          | <b>Cantidad (g/l)</b> |
|-------------------------------|---|-----------------------|
| Nitrato de amonio             | $\text{NH}_4\text{NO}_3$                  | 4.000                 |
| Fosfato monopotásico          | $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 4.700                 |
| Fosfato de disodio            | $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                 | 0.119                 |
| Cloruro de calcio dihidratado | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.100                 |
| Sulfato de magnesio           | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1.000                 |
| Sulfato de manganeso          | $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.010                 |
| Sulfato ferroso               | $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | 0.015                 |

Posteriormente, se realizaron dos ciclos de centrifugación (ThermoFisher Scientific Sorvall ST 16R) de  $5.000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 10 min. Se conservó el sobrenadante de cada cultivo y se guardó en refrigeración a  $4^\circ\text{C}$  para los ensayos posteriores. El precipitado obtenido fue lavado dos veces con MSM estéril y resuspendido en el mismo medio. De igual manera, el precipitado fue almacenado en las mismas condiciones para la identificación molecular de las cepas microbianas. Esta metodología se basó en lo descrito por Ibrahim, 2016; Morikawa et al., 2000; Najafi et al., 2010; Saikia et al., 2012 y Zhang et al., 2012, con modificaciones.

Tanto para la prueba de desplazamiento de hidrocarburo y el porcentaje de emulsificación (E24), se evaluaron dos factores en estudio: tipo de hidrocarburo (H) y el tipo de microorganismo (M) (microorganismos recuperados a partir del aceite usado de motor). Ambos factores presentaron cuatro niveles teniendo así para el tipo de hidrocarburo: H1: diésel, H2: aceite usado, H3: aceite nuevo, y H4: petróleo liviano; mientras que para el tipo de microorganismos fueron: M1: BR1Pb-3, M2: BR1Pb-4, M3: DR3Pe-1 y M4: Mezcla de los tres aislados recuperados. Así se obtuvieron los tratamientos que se observan en la Tabla 5.

Tabla 5.

*Tratamientos para los ensayos de degradación de hidrocarburo*

| <b>Tratamientos</b> | <b>Codificación</b> | <b>Significado</b>         |
|---------------------|---------------------|----------------------------|
| 1                   | H1M1                | Diésel + BR1Pb-3           |
| 2                   | H1M2                | Diésel + BR1Pb-4           |
| 3                   | H1M3                | Diésel + DR3Pe-1           |
| 4                   | H1M4                | Diésel + Mezcla            |
| 5                   | H2M1                | Aceite usado + BR1Pb-3     |
| 6                   | H2M2                | Aceite usado + BR1Pb-4     |
| 7                   | H2M3                | Aceite usado + DR3Pe-1     |
| 8                   | H2M4                | Aceite usado + Mezcla      |
| 9                   | H3M1                | Aceite nuevo + BR1Pb-3     |
| 10                  | H3M2                | Aceite nuevo + BR1Pb-4     |
| 11                  | H3M3                | Aceite nuevo + DR3Pe-1     |
| 12                  | H3M4                | Aceite nuevo + Mezcla      |
| 13                  | H4M1                | Petróleo liviano + BR1Pb-3 |
| 14                  | H4M2                | Petróleo liviano + BR1Pb-4 |
| 15                  | H4M3                | Petróleo liviano + DR3Pe-1 |
| 16                  | H4M4                | Petróleo liviano + Mezcla  |

### **3.4.1 Prueba de desplazamiento del hidrocarburo para la detección de biosurfactantes**

Esta prueba se realizó con la finalidad de evaluar la presencia de surfactantes excretados por los microorganismos y que puedan estar presentes en el medio o sobrenadante de cada aislado. Consiste en verificar la formación de un halo de desplazamiento del hidrocarburo analizado en agua, siendo un resultado positivo para la presencia de biosurfactantes si se da dicho desplazamiento (Mohanram et al., 2016).

En una caja Petri (100x15 mm) se dispuso 20 ml de agua destilada y 20 µl de la fuente de carbono hasta formar una película. En el centro de la película se colocó 10 µl de cada sobrenadante obtenido. Se realizaron 3 repeticiones por cada sobrenadante de cepa aislada e hidrocarburo contaminante, más un control negativo que consistía medio de cultivo MSM estéril. A continuación se midió el halo de desplazamiento que se formó utilizando un escalímetro (Vernier Digital Caliper 0-150 mm) y se recolectaron los datos para su análisis estadístico (Zhang et al., 2012; Hina et al., 2017; Ibrahim, 2016; Mohanram et al., 2016; Xia et al., 2012).

Para determinar las diferencias entre los tratamientos, se realizó un ANOVA ajustado a un modelo de DBCA con arreglo factorial (Tabla 6). Los datos se transformaron con una función logarítmica para cumplir con los supuestos de la

estadística paramétrica. Se aplicó pruebas de significancia estadística a posteriori en todas las fuentes de variación (Tabla 6) que resultaron significativas después de la realización del ANOVA.

### 3.4.2 Prueba de actividad de emulsificación (E<sub>24</sub>)

Con las muestras positivas para la presencia de surfactantes obtenidas en el ensayo anterior, se procedió a realizar la prueba de emulsión. Esta prueba consistió en evaluar la presencia de una capa de emulsión, formada por la interacción de los surfactantes presentes en el sobrenadante de cada aislado con los hidrocarburos. Al formarse la capa de emulsión entre el sobrenadante y el contaminante, se interpretó que los biosurfactantes producidos por los microorganismos en estudio poseen actividad emulsificante (El-Sheshtawy et al., 2015). Es así que estos se identificaron como potenciales surfactantes con posible utilidad biodegradativa de hidrocarburos en futuros procesos de biorremediación (Riojas et al., 2010).

Para realizar esta prueba, en un tubo falcon de 15 ml, se colocó 3 ml del sobrenadante de cada aislado junto con 3 ml de cada hidrocarburo; posteriormente, se homogenizó por Vortex Mixer (Globe Scientific In Model #500) durante 3 minutos y se dejó reposar por 24 h a 25°C en una estufa de secado (MEMERT Tv 400) hasta su medición (Ebadi et al., 2017<sup>a</sup>; Ebadi, Khoshkholgh Sima, Olamaee, Hashemi, y Ghorbani Nasrabadi, 2017<sup>b</sup>; Hina et al., 2017; Ibrahim, 2016; Mohanram et al., 2016). La fórmula para calcular el índice de emulsión (E<sub>24</sub>) se detalla como:

$$E_{24}(\%) = \frac{\text{altura de la capa de emulsión}}{\text{altura de la solución total}} \times 100$$

Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de emulsificación

Donde el resultado expresa en porcentaje, el índice de emulsificación observado a las 24 horas de iniciado el experimento (Sarubbo, 2006).

En este experimento, se realizó un ANOVA ajustado a un modelo de DBCA con arreglo factorial para determinar las diferencias entre los tratamientos (Tabla 5). Para cumplir con los supuestos de la estadística paramétrica, se hizo una transformación de los datos con la función arcoseno. Posteriormente, se empleó pruebas de significancia

estadística con la prueba de Tukey al 5% en todas las fuentes de variación (Tabla 6) que resultaron significativas.

Tabla 6.

*Esquema del análisis de los ensayos de desplazamiento de hidrocarburo y E24*

| <b>FdV</b> | <b>GI</b> |
|------------|-----------|
| Total      | 47        |
| A          | 3         |
| B          | 3         |
| AxB        | 9         |
| Repetición | 2         |
| Error      | 30        |

### **3.5 Caracterización molecular**

Los aislados obtenidos que presentaron actividad degradativa de hidrocarburos fueron enviados al laboratorio ID-Gen, en la ciudad de Quito, para la identificación de especie.

De acuerdo con este laboratorio, la extracción de ADN se realizó por métodos convencionales comerciales utilizando aproximadamente 100mg de precipitado bacteriano. Se realizó electroforesis horizontal en gel de agarosa para evaluar la integridad y calidad del ADN. El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de 20ng/uL aproximadamente. Se realizó la amplificación del gen *rss* que codifica para la secuencia de ARNr 16s mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores universales 27F y 1492R. Los productos de PCR fueron purificados previo a su secuenciación mediante el método SANGER. Las secuencias obtenidas fueron procesadas y ensambladas usando el programa informático MEGA X versión 10.0.4. Se compararon las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), con una similitudes igual o superior al 98% de identidad.

### **3.6 Análisis estadístico**

Todas las pruebas estadísticas se realizaron por triplicado, incluyendo controles, y fueron evaluadas utilizando el programa IBM SPSS Statistics, Versión 22. El nivel de significancia utilizado fue  $p=0.05$ , tomando en cuenta las fuentes de variación para cada experimento (Tabla 3; Tabla 6).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

En el presente capítulo se dará a conocer los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente investigación analizando los datos adquiridos previamente tanto de los microorganismos aislados como de su capacidad de degradar hidrocarburos.

#### 4.1 Aislamiento de microorganismos

Se encontraron diferencias significativas en los tratamientos ( $F=14.94$ ;  $gl=11$ ;  $6$ ;  $p<0.05$ ). Al medir la absorbancia de todos los tratamientos, la dilución que se mantuvo en el rango de  $OD_{600}=1$  fue la concentración de  $0.01 \mu\text{l/ml}$  siendo la más viable en cuanto al crecimiento de los microorganismos existentes en el cultivo (Figura 2). Pese a que la dilución  $0.1 \mu\text{l/ml}$  presentó valores mayores a 1, la viabilidad de cultivo en cuanto a la formación de colonias no fue la misma, debido a que en los cinco días de cultivo presentó valores de 0 en las UFC.

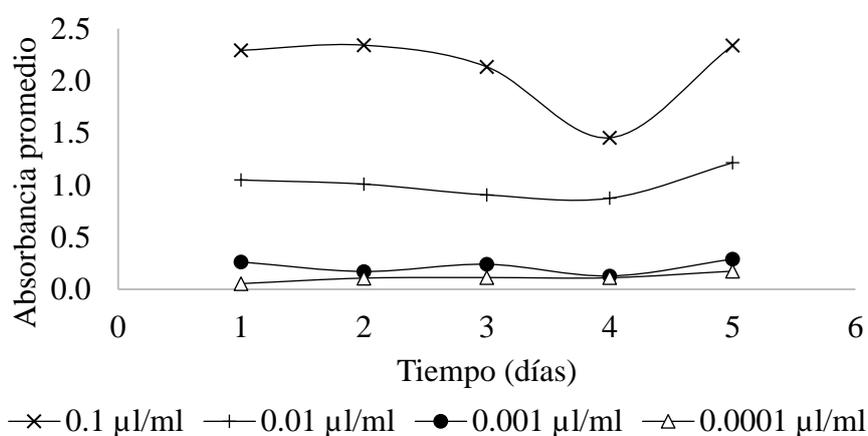
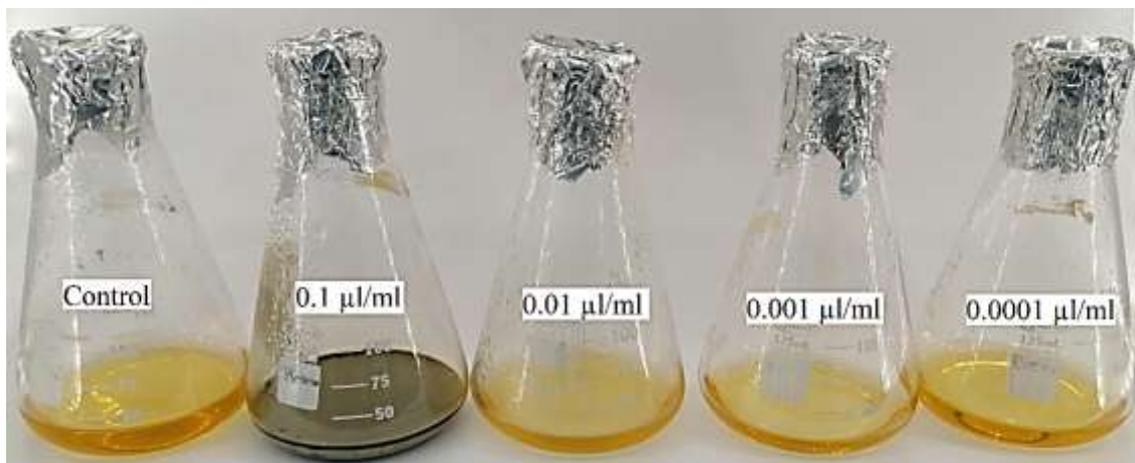


Figura 2. Datos de la absorbancia promedio de los tratamientos

Adicionalmente, se observó la turbidez de las soluciones (Figura 3) durante los días del experimento. Se obtuvo que en la solución de  $0.1 \mu\text{l/ml}$  se formó una película de color gris que se mezcló con casi todo el caldo. Sin embargo, cuando se realizaron los cultivos en agar nutriente, no se observó la formación de dicha película. En las diluciones

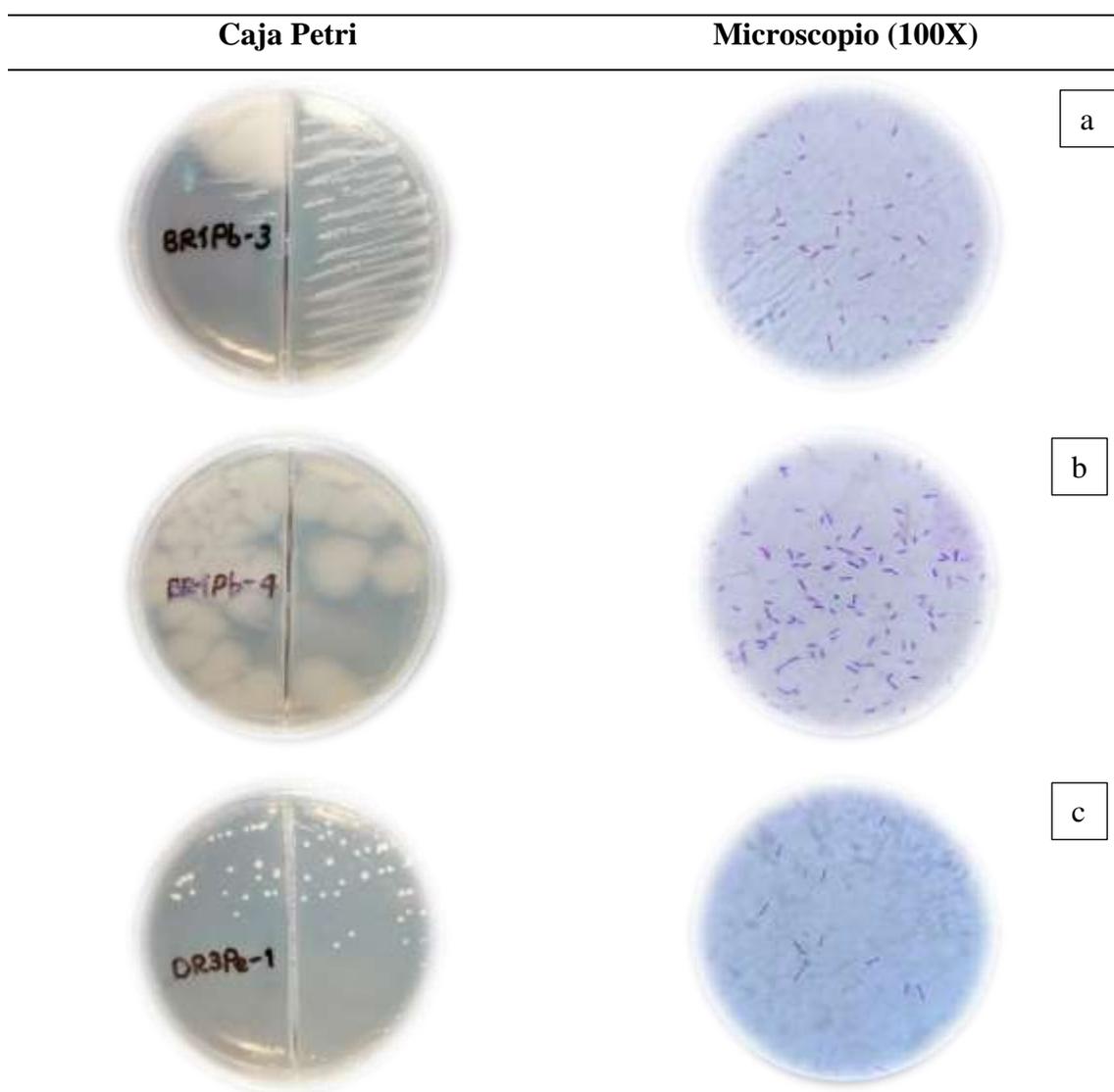
de 0.01 y 0.001  $\mu\text{l/ml}$  se observaron cambios en la turbidez al compararlas con el control. En la solución de 0.0001  $\mu\text{l/ml}$  el cambio de turbidez fue mínimo.



*Figura 3.* Diluciones de la muestra en caldo nutriente a los 5 días del experimento

En cuanto a los resultados del conteo de UFC, en su mayoría, los datos obtenidos de los cultivos presentaban valores de 0. Por tal razón no se realizó un análisis estadístico de los mismos. A lo largo de los cinco días de ensayo, se obtuvo un total de 22 colonias aisladas de todos los tratamientos, que crecieron en agar nutriente. De estas colonias, al inocularlas en Agar Pseudomonas® transcurridas 24 horas de su cultivo se obtuvieron 3 cultivos puros. Dos recuperados a partir de las diluciones de 0.01  $\mu\text{l/ml}$  del segundo día de cultivo y uno recuperado de la dilución 0.0001  $\mu\text{l/ml}$  del quinto día de cultivo (DR3Pe-1, BR1Pb-4 y BR1Pb-3 respectivamente).

Las colonias aisladas presentaron coloración blanquizca en el medio de cultivo y forma circular definida. Una vez realizada la tinción de Gram de las cepas aisladas DR3Pe-1, BR1Pb-4 y BR1Pb-3, éstas se tiñeron de color violeta, al observarlas al microscopio y debido a su forma diferenciada, se identificaron como bacilos Gram positivos (Figura 4).



*Figura 4.* Microscopía de los aislados a) aislado BR1Pb-3, b) aislado BR1Pb-4, c) aislado DR3Pe-1,

#### 4.2 Composición de los hidrocarburos

En el análisis realizado a cada hidrocarburo se obtuvieron los porcentajes de concentración presentados en la Tabla 7 para los elementos: Nitrógeno; Carbono y Azufre. Se puede observar que el hidrocarburo que presentó mayor contenido en Nitrógeno fue el diésel (0.87 %), mientras que el de menor contenido fue el aceite lubricante nuevo (0.42 %). Para el Carbono el hidrocarburo que tuvo mayor contenido fue el diésel (86.53 %) y el de menor es el petróleo liviano (79.49 %). Finalmente, para el Azufre, el que tuvo mayor contenido fue el petróleo liviano (1.13 %) y el de menor contenido fue el diésel (0.41 %).

Tabla 7.

*Composición elemental de los hidrocarburos*

| <b>Hidrocarburo</b>     | <b>N (%)</b> | <b>C (%)</b> | <b>S (%)</b> |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Diesel                  | 0.87         | 86.53        | 0.41         |
| Aceite usado de motor   | 0.65         | 84.16        | 0.63         |
| Aceite lubricante nuevo | 0.42         | 85.15        | 0.65         |
| Petróleo liviano        | 0.66         | 79.49        | 1.13         |

### 4.3 Pruebas de degradación de hidrocarburos

A continuación, se presentarán los resultados obtenidos en la prueba de desplazamiento del hidrocarburo y prueba de emulsificación. Al final se hace un contraste entre los resultados obtenidos en ambas pruebas.

#### 4.3.1 Prueba de desplazamiento del hidrocarburo

La prueba de desplazamiento determinó que todas las cepas aisladas producen biosurfactantes ya que en todos los ensayos se pudo observar la formación de un halo de desplazamiento (Figura 5). Mediante el análisis de los datos ( $F= 29.84$ ,  $gl= 47; 30$ ,  $p<0.05$ ), se obtuvo que el sobrenadante que presentó un mayor halo de desplazamiento en diésel fue de la cepa BR1Pb-4 (46.80 mm) y el de menor halo (12.43 mm) se obtuvo de la cepa BR1Pb-3 (Figura 6). Para el aceite usado, el sobrenadante del aislado con mayor halo (4.91 mm) fue BR1PB-4 y el de menor halo (3.46 mm) fue de la cepa DR3Pe-1. En aceite nuevo, el de mayor halo (8.92 mm) fue la mezcla de todos los sobrenadantes obtenidos a partir de las cepas, mientras que el de menor valor (3.01 mm) fue del aislado BR1Pb-3. Finalmente, para petróleo liviano, el sobrenadante de mayor halo (12.26 mm) fue de la mezcla de los tres sobrenadantes y el de menor valor (6.83 mm) fue la cepa BR1Pb-4 (Figura 6).

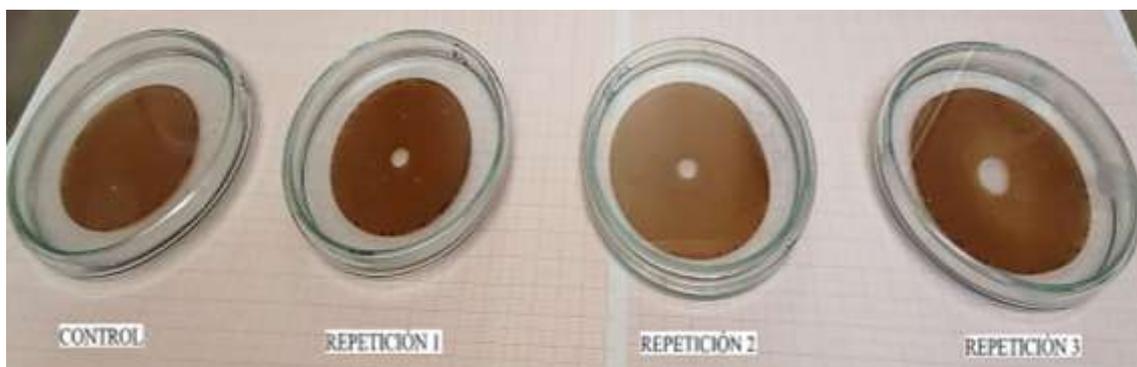


Figura 5. Prueba de halo de desplazamiento en petróleo liviano con el aislado BR1Pb-3

Mediante la prueba de Tukey, se determinó que los surfactantes producidos por el aislado BR1Pb-4 son más efectivos cuando se encuentra en contacto con diésel. Por tal razón se ubica en el subconjunto A. Mientras que, el sobrenadante con surfactante menos efectivo fue el del aislado BR1Pb-3 cuando reaccionó con aceite nuevo, de esta manera se ubicó en el subconjunto G (Figura 6). Cuando se compara la reacción de los sobrenadantes de cada uno de los aislados con la mezcla de estos, se puede observar que la mezcla se mantiene en un valor aproximadamente similar al de los demás tratamientos (diésel=40.59 mm; aceite usado=4.83 mm; aceite nuevo=8.92 mm y petróleo liviano=12.26 mm).

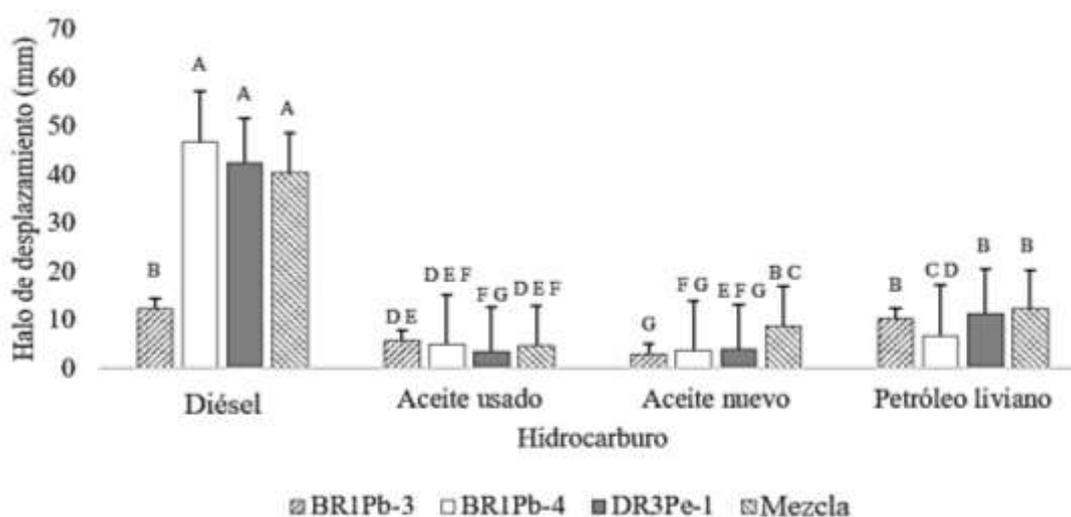


Figura 6. Promedio del halo de hidrólisis para cada aislado a partir de los sobrenadantes estudiados

#### 4.3.2 Prueba de actividad de emulsificación (E<sub>24</sub>)

A través del análisis de la prueba de porcentaje de emulsificación (E<sub>24</sub>), los sobrenadantes de las cepas que presentaron mayor porcentaje de emulsificación en relación con diésel (5.52%); aceite usado (67.63%); aceite nuevo (88.01%) y petróleo liviano (96.67%) fue la mezcla de los sobrenadantes de todos las cepas (Figura 7). En tanto que los sobrenadantes de las cepas que presentaron menor porcentaje de emulsificación en relación con diésel (2.57%) fue BR1Pb-3; aceite usado (42.18%) fue BR1Pb-4; aceite nuevo (72.81%) fue BR1Pb-3 y para petróleo liviano (76.20%) fue DR3Pe-1.

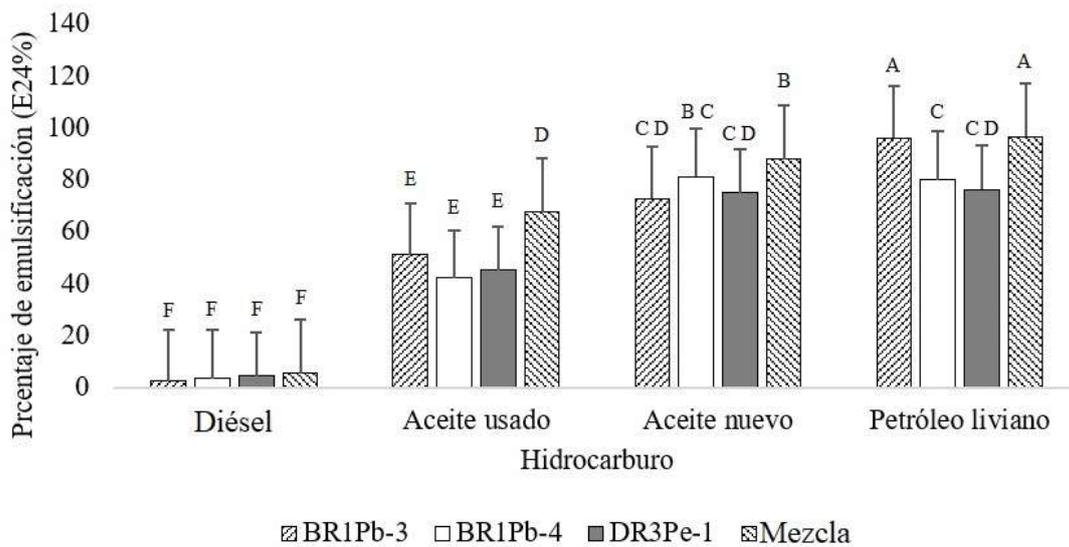


Figura 7. Promedio de E<sub>24</sub> para cada sobrenadante de las cepas estudiadas

Los resultados de la prueba de Tukey demostraron que el tratamiento que mayor porcentaje de emulsificación produjo fue el de la mezcla de todos los sobrenadantes cuando reaccionaron con el petróleo liviano, situándose en el subconjunto A. Sin embargo, y con un valor similar, en el mismo subconjunto también se ubicó el sobrenadante del aislado BR1Pb-3 cuando reaccionó con el petróleo liviano. En el último subconjunto (F), se ubicó el sobrenadante del aislado BR1Pb-3 cuando reacciona con diésel. No obstante, todos los sobrenadantes presentan valores menores con diésel en comparación con aceite usado, aceite nuevo y petróleo liviano. Es así que todos se encuentran en el subconjunto F (Figura 7).



Figura 8. Prueba de emulsificación en aceite usado con el aislado BR1Pb-3 (A: aceite usado sin emulsionar; B: capa de emulsificación; C: sobrenadante)

En este experimento se determinó que la mezcla de los sobrenadantes se mantiene siempre en un rango de emulsificación mayor cuando se compara con los sobrenadantes de cada aislado. Al hacer una correlación de la prueba de halo de desplazamiento y el porcentaje de emulsificación, se obtiene que, a mayor concentración de surfactante, existe menor capacidad de emulsificar el hidrocarburo ( $y = -1.6283x + 78.097$ ;  $R^2 = 0.5007$ ).

#### 4.4 Caracterización molecular

Al realizar la electroforesis del producto de PCR de los 3 aislados BR1Pb-3, BR1PB-4 y DR3Pe-1, se visualizó bandas con un peso molecular de 1500 pb aproximadamente al ser comparadas con el marcador de peso molecular. Esto comprueba que se amplificó el gen 16s. Luego del proceso de secuenciación, al analizar las secuencias en la base de datos Gen Bank se identificó que el aislado BR1Pb-4 corresponde a la especie *Bacillus thuringiensis* con un porcentaje de similitud de 99.03%. Los aislados BR1Pb-3 y DR3Pe-1 con un porcentaje de similitud de 99.45% y 99.54% respectivamente, corresponden al género *Bacillus*, compartiendo similaridad con las especies *Bacillus albus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus paramycoides* o *Bacillus anthracis* tal y como se observa en la Tabla 8.

Tabla 8.

*Resultados de la caracterización molecular de los aislados*

| Muestra | Organismo posible             | Fragmento secuenciado | % de identidad | N° Accesoión |
|---------|-------------------------------|-----------------------|----------------|--------------|
| BR1Pb-3 | <i>Bacillus albus</i>         |                       |                | NR_157729.1  |
|         | <i>Bacillus cereus</i>        |                       |                | KY628813.1   |
|         | <i>Bacillus paramycoides</i>  | 16S                   | 99.45          | NR_157734.1  |
|         | <i>Bacillus anthracis</i>     |                       |                | CP007666.1   |
| BR1PB-4 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | 16S                   | 99.03          | MK795821.1   |
| DR3Pe-1 | <i>Bacillus albus</i>         |                       |                | NR_157729.1  |
|         | <i>Bacillus cereus</i>        |                       |                | KY628813.1   |
|         | <i>Bacillus paramycoides</i>  | 16S                   | 99.54          | NR_157734.1  |
|         | <i>Bacillus anthracis</i>     |                       |                | CP007666.1   |

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

#### 5.1 Bacterias aisladas

El fenómeno descrito por Venkateswaran et al. (1995) se entiende como un fenómeno que podría influenciar en la capacidad de identificar la verdadera diversidad de microorganismos en la muestra, ya que los aislados que se observan en la placa tal vez son microbiota menor y no la que realmente está dominando en la muestra. A esto se le conoce como sesgo en la técnica de enriquecimiento. De forma general, cuando se incrementa la dilución baja la concentración de células que se encuentran en un sustrato lo cual explica la baja drástica de bacterias aisladas en la dilución de 0.0001 µl/ml. Sin embargo, y como se menciona previamente pueden ser microorganismos que se adaptaron mejor al medio de cultivo, pero puede que no represente la microbiota total de la muestra.

En la presente investigación, pese a que se observó el crecimiento de varias colonias de diferente morfología en Agar Nutriente, no todas demostraron desarrollo en el medio de cultivo Agar Pseudomonas. Posiblemente, este medio no presentaba todos los requerimientos que necesitaban las colonias aisladas a partir de Agar Nutriente, tal vez debido a que los aislados no pertenecían a este género. Otra razón podría ser como se explica en la investigación de Bushnell y Haas (1940), que el medio no permitió la adaptación de los aislados debido a su composición o falta de hidrocarburo. Esto explicaría el número reducido de aislados obtenidos en este estudio.

En distintas investigaciones, las bacterias aisladas de sitios contaminados con hidrocarburos pertenecen a géneros distintos de *Pseudomonas* (Hassanshahian et al., 2012; Matsui et al., 2014; Sarkar et al., 2017), aunque su género destaca al igual que *Bacillus* y otros (Pérez et al., 2008). En el caso de este estudio, los tres aislados se identificaron como especies pertenecientes al género *Bacillus*. Sin embargo, la presente investigación se centró en el aislamiento de especies pertenecientes al género *Pseudomonas*, a partir de aceite usado de motor, es así que se utilizó el medio de cultivo Agar Pseudomonas para su aislamiento. No obstante, el medio utilizado en su ficha técnica específica que se pueden encontrar cepas que no pertenezcan a *Pseudomonas* sp., y que no están completamente inhibidas en este medio. Entre ellas, se encuentran las especies pertenecientes al género *Bacillus*.

El aislado BR1Pb-4 fue identificado como *Bacillus thuringiensis*. De esta especie bacteriana existe una cantidad limitada de estudios (Thamer et al., 2013; Jiang et al., 2015; Marchlewicz et al., 2016), sin embargo, ha sido identificada como degradadora de hidrocarburos (entre ellos, diésel, aceite crudo y aceite usado de motor). Incluso se ha combinado especies fúngicas como *Pleurotus cornucopiae* con *B. thuringiensis* para la biorremediación del suelo (Jiang et al., 2015). En la identificación molecular de los aislados BR1Pb-3 y DR3Pe-1 se obtuvo que sus secuencias del marcador molecular 16s tenían un porcentaje de similitud superior al 99% para distintas especies del género *Bacillus*. Esto ha sido reportado anteriormente ya que se ha registrado más del 99% de similitud de la secuencia de la estructura primaria del RNAr16S entre *B. cereus*, *B. anthracis*, y *B. mycoides* (Pérez, 2012).

Sin embargo, existe evidencias de que la especie *B. cereus* ha sido aislada y utilizada en procesos de biorremediación y degradación de hidrocarburos (Bhurgri et al., 2018; Patowary et al., 2016). Al igual que *B. anthracis* que ha sido encontrada dentro de los consorcios bacterianos de aguas y suelos contaminados con hidrocarburos (Dash et al., 2013). Se sabe que las bacterias Gram-positivas, incluidas las especies de *Bacillus*, son tolerantes a muchos compuestos tóxicos como fenoles, hidrocarburos aromáticos, metales pesados y diferentes solventes orgánicos (Marchlewicz et al., 2016). Es así que, en el estudio de Kubota et al., (2008) cuando se usó aceite residual de motor de automóvil como sustrato para el aislamiento de bacterias que degradan hidrocarburos se encontraron bacterias del género *Bacillus*, entre estas *B. subtilis*, *B. anthracis* y *B. thuringiensis*, que presentaron porcentajes muy altos de degradación en el aceite usado de motor (99.4%, 100% y 100%, respectivamente).

En una investigación similar, las especies aisladas a partir de suelo contaminado con aceite usado de motor fueron identificadas como *Acinetobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia* sp., *Bacillus megaterium* y *Corynebacterium* sp. (Abioye et al., 2012). Como se ha mencionado anteriormente, entre los microorganismos aislados a partir de sitios contaminado con aceite usado de motor, se puede verificar que existen especies bacterianas del género *Bacillus*, por lo que los aislados identificados en la presente investigación forman parte del grupo de especies destacadas en la degradación de hidrocarburos.

## 5.2 Pruebas de degradación de hidrocarburos

### 5.2.1 Prueba de halo de desplazamiento

Todos los tratamientos presentaron diferencias significativas en su evaluación ( $F=29.84$ ,  $gl=47; 30$ ,  $p<0.05$ ). Con los resultados obtenidos en este ensayo, se puede interpretar que todos los aislados producen algún tipo de surfactante debido a evidencias previas de este tipo de ensayo realizado por otros autores (Joy et al., 2017; Yu y Huang, 2011). Pese a esto, se comprobó que las cepas estudiadas no generan la misma cantidad de biosurfactante o el biosurfactante que producen no posee la misma afinidad por los diferentes tipos de hidrocarburos contra los cuales fueron evaluados. Al realizar este ensayo, los sobrenadantes de los aislados tenían medidas distintas en el halo de desplazamiento. Una explicación a este suceso puede ser que los microorganismos producen diferentes surfactantes debido a su metabolismo (glucolípidos y lipopéptidos, en el caso del género *Bacillus*) (Najafi et al., 2010), los cuales poseen distintas capacidades para solubilizar compuestos orgánicos hidrofóbicos (Lange y Warger, 1987). En consecuencia, se presume que los biosurfactantes son específicos para distintos compuestos contaminantes.

Otra posible explicación es la influencia de las condiciones pH, temperatura, oxígeno, nutrientes a las cuales se mantuvieron las cepas en cultivo previo a las pruebas de degradación. Al-Hawash et al. (2018) mencionan que dependiendo de la zona en la que se vaya a probar el biosurfactante para degradar contaminantes, la temperatura debe mantenerse en un rango de 15-20°C en suelos, 30-40°C en ambientes marinos y 20-30°C en ambientes de agua dulce. De igual forma la producción de biosurfactante se ve limitada por la disponibilidad de oxígeno en el medio, puesto que algunas bacterias lo hacen en presencia o ausencia de oxígeno (Grishchenkov et al., 2000). Estas condiciones no se tomaron en cuenta en los ensayos de degradación, debido a que fueron ensayos *ex situ* a escala laboratorio. Sin embargo, pudo ser una de las razones por las que los halos producidos por los aislados fueron de distintas medidas.

Ibrahim (2016) afirma que ciertos microorganismos pueden producir biosurfactantes y secretarlos extracelularmente en el medio de crecimiento y esto se interpreta como una acción biodegradativa de hidrocarburos. Como se evidencia en la Figura 6, todos los aislados muestran la formación del halo de desplazamiento; sin

embargo, la relación de estos cuando están en contacto con el diésel es mayor, excepto por el sobrenadante del aislado BR1Pb-3 que pudo deberse a la afinidad del biosurfactante producido con relación al diésel. Lo antes mencionado puede ocurrir debido a que se ha demostrado una mayor persistencia de los biosurfactantes con el diésel ya que éste se encuentra formado por hidrocarburos de cadena larga y de mayor peso molecular (Barros et al., 2008). Adicionalmente, también depende del tipo de biosurfactante que haya reaccionado con el hidrocarburo ya que bacterias del género *Bacillus* producen Gramicidinas, Polimixina E1, Surfactina, subtilisina, subsporina, Lichenysin G, Bacilomicina L, Iturin A, Fengicina (plipastatina) y Micobacilina (Kosaric & Sukan, 2015), por lo que para explicar de mejor manera este fenómeno se debería caracterizar el tipo de biosurfactante producido por cada aislado.

Torres, Orantes, y Iturbe (2003) reportaron que obtuvieron una cepa que presentó mejores resultados en la degradación del diésel pues mencionan que existe un aumento en la superficie de contacto celular al estar en presencia de surfactantes (Bardi et al., 2000). Al relacionar los resultados del ensayo de desplazamiento con este estudio, se puede evidenciar similitudes, pues fue con el diésel en donde se observó un mayor efecto de desplazamiento, posiblemente por un mejor contacto de los surfactantes con el sustrato. Esto puede explicarse a que los surfactantes se adhieren a los hidrocarburos y permiten su dispersión (Kosaric & Sukan, 2015), sin embargo, depende del tipo de biosurfactante producido por las bacterias para saber las propiedades específicas que posee cada uno y la forma de acción que tienen ante los distintos contaminantes.

### **5.2.2 Prueba de emulsificación (E<sub>24</sub>)**

En este ensayo se pudo comprobar que los surfactantes presentes en el sobrenadante poseen capacidad emulsificante puesto que todos demostraron la creación de interfases entre el sobrenadante y el hidrocarburo. Sin embargo, y pese a que en el experimento del halo de desplazamiento mostró valores mayores con relación al diésel (Figura 6), no se obtuvieron los mismos resultados en cuanto a la capacidad de emulsificar este compuesto (Figura 7). La razón por la cual puede ocurrir este fenómeno, podría deberse a que los biosurfactantes requieren de un proceso de purificación para ser utilizados y aumentar su capacidad emulsificante (Banat et al., 2000). Además, se ha mencionado que la concentración del surfactante en el medio y el valor del pH se

relacionan directamente con los fenómenos de emulsificación, puesto que a mayor pH, mayor índice de emulsificación que puede generar (Giraldo et al., 2014).

También la naturaleza química de cada compuesto pudo influir en la emulsificación de estos, pues se ha reportado que la biodegradación se hace más difícil cuando la parte hidrofóbica de la molécula es ramificada (Riojas et al., 2010), tal y como es la estructura química del diésel ( $C_{10}H_{20}$ ). Se sabe que los surfactantes pueden ser sensibles a la exposición ambiental, a los hidrocarburos y su composición (Ismail et al., 2019), y en consecuencia, pueden perder sus capacidades degradativas en condiciones no aptas para su funcionamiento. Es así como, en este estudio, al relacionar la presencia de los surfactantes con su capacidad emulsificante, se obtuvo que los resultados son inversamente proporcionales. Pues a mayor presencia de surfactante, menor es la capacidad emulsificante que poseen. Esto pudo deberse a que las condiciones en las que se encontraba no eran las óptimas para su funcionamiento, pues como se ha mencionado previamente, se han obtenido mejores resultados de degradación a altas temperaturas y a un determinado pH (Al-Hawash et al., 2018).

Se ha reportado que la acción del surfactante también depende de su pérdida de actividad y su accionar con el contaminante; pues al no encontrarse en condiciones adecuadas pierden su capacidad degradativa y eficiencia de solubilización (Gong et al., 2009; Tiehm, 1994). Al igual que en esta investigación Walker, Petrakis, y Colwell, (1976) obtuvieron diferencias importantes en la susceptibilidad a la degradación de cada uno de los componentes dentro de los hidrocarburos probados (86% para aceite crudo, y 11% para diésel). Esto explicaría la variación del porcentaje de emulsificación de cada hidrocarburo con los aislados, de modo que da un indicio de menor capacidad, en general, para emulsificar diésel. En los resultados de su composición química, fue el que mayor porcentaje de carbono tuvo (86.53%), por lo tanto, podría ser una explicación a que su emulsificación fue menor.

En esta investigación los valores de pH del medio y concentración de surfactante no fueron evaluados. Pese a esto, se obtuvieron resultados prometedores para concluir que los microorganismos estudiados estarían produciendo surfactantes con actividad emulsificante. En estudios similares, se ha determinado que los biosurfactantes son muy efectivos para emulsionar hidrocarburos (Barros et al., 2008). No obstante, sus propiedades dependen de cada microorganismo y de la especificidad de los productos

excretados al medio de cultivo (Narváez Flórez et al., 2016). Es así que, en este estudio, los surfactantes obtenidos del caldo nutriente en el que fueron cultivadas las bacterias reaccionaron de distinta manera en cuanto a la emulsificación de cada hidrocarburo.

En comparación con este estudio, entre los aislados de fuentes marinas que fueron capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos, *B. cereus* es una de las más representativas (Samanta et al. 2002). Liu et al., (2016), demostraron que una cepa de *Bacillus* sp. tenía alta capacidad degradativa para el aceite crudo en tolerancia a altas temperaturas, salinidad y alcalinidad. La presente investigación no logró profundizar en las condiciones a las cuales se tiene una mejor degradación de los hidrocarburos. Tampoco se enfocó en conocer el contenido exacto de surfactantes, ni el tipo de surfactante ya que no formaba parte de los objetivos del trabajo. Sin embargo, los resultados obtenidos para ambos experimentos, con las cepas aisladas del género *Bacillus*, se pueden relacionar entre sí, ya que muestran presencia de biosurfactantes producidos extracelularmente por las bacterias, y su capacidad emulsificante para degradar diferentes hidrocarburos (Al-Hawash et al., 2018).

Las especies *B. subtilis*, *B. pumilus* y *B. licheniformis* producen ciertos tipos de surfactantes, entre ellos la Lichensina A, B y también Surfactina; esta última, a pesar de encontrarse en bajas concentraciones es uno de los biosurfactantes más efectivos (Mulligan, 2005). *B. thuringensis* es también una de las cepas bacterianas que ha sido estudiada en su efecto para biorremediación en pozos petroleros (Torres y Velho, 2010). *B. cereus* igualmente ha sido identificada como una especie degradadora de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHAs) ya que los utiliza como fuente de carbono y energía (Ding et al., 2016). Como se mencionó previamente, las especies bacterianas de este estudio fueron identificadas como especies del género *Bacillus*, que se conoce que son degradadoras de hidrocarburos.

En los resultados de los experimentos de halo de desplazamiento y emulsificación se tiene una relación inversamente proporcional; pues a menor presencia de surfactante existe mayor capacidad emulsificante. Esto puede deberse a la variedad de biosurfactantes que producen las bacterias del género *Bacillus* (glucolípidos y lipopéptidos) (Kosaric & Sukan, 2015), cada una podría tener capacidad emulsificante pero, podría verse reducida por otras propiedades que tienen los surfactantes (en algunos casos son dispersantes, espumantes y detergentes) (Walter, Syldatk, & Hausmann, 2010). Sin embargo, y pese a

que no se conoce el tipo de surfactante producido por cada aislado, se pudo observar que al menos alguno posee la capacidad de emulsificar los hidrocarburos con los cuales fueron evaluados.

Al hacer una comparación entre los sobrenadantes de los aislados contra la mezcla de todos éstos, se puede evidenciar que la mezcla se mantiene entre los valores mayores de presencia de surfactante y de emulsificación. Esto puede deberse a la suma de los surfactantes producidos por cada microorganismo, a la propiedad que tenga este (Riojas et al., 2010) o de las características de cada surfactante, pues se sabe son propias para cada microorganismos (Riojas et al., 2010). Mariano et al. (2008) compararon la biodegradación de los aceites y diésel, comerciales y desgastados, y concluyeron que los consorcios bacterianos tenían un mejor potencial de biodegradación que los cultivos puros. Es así que especies de *Pseudomonas* sp., *Brevihacteriurn* sp., *Alculzgenes* sp. y *Arthrohacter* sp., además de bacterias de *Bacillus* sp. han sido utilizados como consorcios para tratar sitios contaminados, obteniendo buenos resultados (Rontani et al., 1985).

Lo antes mencionado puede suceder debido a la variedad de compuestos que producen extracelularmente cada microorganismo. Cuando se tiene consorcios bacterianos, se puede tener una mayor degradación por los distintos surfactantes que produce cada especie del consorcio; o a su vez puede deberse a que las bacterias degradan cierta gama de hidrocarburos (Kadali et al., 2012) debido a la especificidad de cada surfactante producido. En el estudio de Pucci et al. (2015), los hidrocarburos que se degradaron, al utilizar el consorcio formado por bacterias de los géneros *Micrococcus*, *Ocrhobactrum*, *Clavibacter*, *Bacillus* sp. y *Rhodococcus* y la especie *Kocuria rosasea*, pertenecían al grupo de los n-alcános y se obtuvo porcentajes de degradación de 100%, 87% y 82% para los compuesto C13, C14 y C15 respectivamente. En este estudio se utilizó la mezcla de los sobrenadantes de los aislados, sin embargo, todos pertenecían a un mismo género, en este caso *Bacillus* lo que pudo ser un limitante en cuanto a la degradación de hidrocarburos ya que no se tenían especies de otros géneros.

Esto es un indicativo de que los microorganismos en consorcio funcionan mejor que un solo aislado. Al igual que en esta investigación se puede evidenciar que con la mezcla de los sobrenadantes de cada aislado, se obtienen resultados superiores en la actividad de emulsificación, pese a que son especies de un solo género taxonómico. De igual manera, en cuanto a la presencia de surfactantes en la prueba de halo de

desplazamiento, se pudo observar que la mezcla se mantiene en el rango mayor de todos los sobrenadantes que reaccionan con los distintos hidrocarburos. En consecuencia, se sugiere que los biosurfactantes, al tener una gran diversidad estructural, actividad biológica específica (Kosaric & Sukan, 2015) y mayor eficiencia para la remediación de sitios contaminados en comparación con los surfactantes químicos sintéticos (Vieira Santos, Silveira, & Barbosa, 2019) podrían usarse para la degradación de los compuestos de petróleo en lugar de los tensioactivos químicos sintéticos y reducir así la contaminación ambiental (Hua et al., 2004).

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1 Conclusiones

- Fue posible el aislamiento de microorganismos a partir de un contenedor de aceite usado de motor, pese a ser un hábitat con condiciones extremas para el crecimiento de microorganismos.
- Todos los aislados obtenidos en el estudio presentaron halo de desplazamiento evidenciando la presencia de biosurfactantes producidos en el medio de cultivo.
- Los microorganismos aislados tienen la capacidad de emulsificar hidrocarburos, considerándolos como potenciales degradadores de hidrocarburos.
- Existe capacidad emulsificante de los surfactantes excretados al medio y esta puede ser limitada por el tipo de hidrocarburo y su composición.
- Los aislados bacterianos fueron identificados como especies pertenecientes al género *Bacillus*.

#### 6.2 Recomendaciones

- Profundizar en la capacidad biodegradativa de los microorganismos aislados para conocer su actividad degradativa y ser consideradas como especies representativas para procesos de biorremediación utilizando pruebas en medios de cultivo o ensayos *ex situ* con suelos y aguas contaminadas.
- Caracterizar los compuestos excretados por los microorganismos al medio de cultivo utilizando cromatografía líquida de alta eficacia, cromatografía de gases o la medida de la tensión superficial dentro de los cultivos.
- Indagar en las rutas metabólicas que emplea cada microorganismo para degradar hidrocarburos y los genes implicados en las mismas para su detección molecular.

- Caracterizar los surfactantes con capacidad emulsificante y las condiciones fisicoquímicas óptimas para la producción microbiana de estos.
- Realizar un estudio *in situ* con los microorganismos aislados para la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos y sus derivados.
- Proponer un modelo de biorreactor para la inmovilización de las bacterias y de sus compuestos.
- Utilizar otros métodos para la identificación molecular de las bacterias aisladas como la técnica de MALDI-TOF o la amplificación de otros marcadores moleculares.
- Realizar un muestreo más amplio para identificar una mayor gama de microorganismos con capacidad biodegradativa de hidrocarburos.

## REFERENCIAS

- Abalos, A., Viñas, M., Sabaté, J., Manresa, M. A., y Solanas, A. M. (2004). Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation*, 15(4), 249–260. <https://doi.org/10.1023/B:BIOD.0000042915.28757.fb>
- Abdulsalam, S., Bugaje, I. M., Adefila, S. S., y Ibrahim, S. (2011). Comparison of biostimulation and bioaugmentation for remediation of soil contaminated with spent motor oil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8(1), 187–194. <https://doi.org/10.1007/BF03326208>
- Abioye, O. P., Agamuthu, P., y Abdul Aziz, A. R. (2012). Biodegradation of Used Motor Oil in Soil Using Organic Waste Amendments. *Biotechnology Research International*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/587041>
- Acosta-Rodríguez, I., Moctezuma-Zárate, M. G., Tovar-Oviedo, J., y Cárdenas-González, J. F. (2011). Aislamiento e identificación de bacterias y levaduras resistentes a petróleo. *Informacion Tecnologica*, 22(6), 103–110. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000600011>
- Al-Hawash, A. B., Dragh, M. A., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H. A., Zhang, X., y Ma, F. (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, Vol. 44, pp. 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>
- Alvarado, J. G., Gregorio, J., Linares, D., y Medina, H. R. (2015). Rol de la Química Orgánica en los procesos de conversión de hidrocarburos. *Educación Química*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2015.08.001>
- Arrieta, O., Rivera, A., Arias, L., Alberto, B., y Cardona, S. (2012). Biorremediación De Un Suelo Con Diesel Mediante El Uso De Microorganismos Autóctonos. *Gestión y Ambiente*, 15(1), 27–40.
- Arutchelvi, J., y Doble, M. (2010). Characterization of glycolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* CPCL isolated from petroleum-contaminated soil. *Letters in Applied Microbiology*, 51(1), 75–82. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02858.x>
- Azeredo, J., Sillankorva, S., y Pires, D. P. (2014). *Pseudomonas Methods and Protocols*. 1149, 23–32. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0>
- Bagherzadeh-Namazi, A.; Shojaosadati, A.; Hashemi-Njafabadi, S. (2008). Biodegradation of used engine oil using mixed and isolates cultures. *International Journal of Environment Research*, 4(1735–6865), 431–440.
- Banat, I. M. (1995). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation : A review. *Bioresource Technology*, 51, 1–12.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., y Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 495–508. <https://doi.org/10.1007/s002530051648>
- Bardi, L., Mattei, A., y Steffan, S. (2000). Hydrocarbon degradation by a soil microbial

- population with  $\beta$ -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(9), 709–713. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00275-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00275-1)
- Barros, F. F. C., De Quadros, C. P., y Pastore, G. M. (2008). Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 28(4), 979–985. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612008000400034>
- Bhattacharya, M., Biswas, D., Sana, S., y Datta, S. (2015). Biodegradation of waste lubricants by a newly isolated *Ochrobactrum* sp. C1. *3 Biotech*, 5(5), 807–817. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0282-9>
- Bhurgri, S., Talpur, F. N., Nizamani, S. M., Afridi, H. I., Surhio, M. A., Shah, M. R., y Bong, C. W. (2018). Isolation of *Bacillus cereus* from botanical soil and subsequent biodegradation of waste engine oil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15(7), 1453–1466. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1502-0>
- Brzeszcz, J., y Kaszycki, P. (2018). Aerobic bacteria degrading both n-alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility. *Biodegradation*, 29(4), 359–407. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9837-x>
- Cameotra, S. S., y Makkar, R. S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(5), 520–529. <https://doi.org/10.1007/s002530051329>
- Chin, S. C., Shafiq, N., y Nuruddin, M. F. (2012). Effects of used engine oil in reinforced concrete beams: the structural performance. *International Journal of Civil, Environmental, Structural, Construction and Architectural Engineering*, 6(3), 932–938.
- Crisafi, F., Genovese, M., Smedile, F., Russo, D., Catalfamo, M., Yakimov, M., ... Denaro, R. (2016). Bioremediation technologies for polluted seawater sampled after an oil-spill in Taranto Gulf (Italy): A comparison of biostimulation, bioaugmentation and use of a washing agent in microcosm studies. *Marine Pollution Bulletin*, 106(1–2), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.017>
- Cybulski, Z., Dziurla, E., Kaczorek, E., y Olszanowski, A. (2003). The influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by *pseudomonadacea* and *bacillacea* strains. *Spill Science and Technology Bulletin*, 8(5–6), 503–507. [https://doi.org/10.1016/S1353-2561\(03\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S1353-2561(03)00068-9)
- Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S., y Das, S. (2013). Marine bacteria: Potential candidates for enhanced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 561–571. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4584-0>
- Deshpande, S., Shiau, B. J. J., Wade, D., Sabatini, D. A. A., y Harwell, J. H. H. (1999). Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. *Water Research*, 33(2), 351–360. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00234-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00234-6)
- Díaz De Rienzo, M. A., Kamalanathan, I. D., y Martin, P. J. (2016). Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 using foam fractionation. *Process Biochemistry*, 51(7), 820–827. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.007>

- Ding, J. M., Yu, T. T., Han, N. Y., Yu, J. L., Li, J. J., Yang, Y. J., ... Huang, Z. X. (2016). Identification and characterization of a new 7-aminocephalosporanic acid deacetylase from thermophilic bacterium *Alicyclobacillus tengchongensis*. *Journal of Bacteriology*, 198(2), 311–320. <https://doi.org/10.1128/JB.00471-15>
- Ebadi, A., Khoshkholgh Sima, N. A., Olamaee, M., Hashemi, M., y Ghorbani Nasrabadi, R. (2017). Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Journal of Advanced Research*, 8(6), 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.06.008>
- Echeverri, G. E., Manjarrez, G., y Cabrera, M. (2010). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *Nova*, 8(13), 76. <https://doi.org/10.22490/24629448.441>
- El-Bestawy, E., El-Masry, M. H., y El-Adl, N. E. (2005). The potentiality of free Gram-negative bacteria for removing oil and grease from contaminated industrial effluents. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6–7), 815–822. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-2239-8>
- El-Sheshtawy, H. S., Aiad, I., Osman, M. E., Abo-ELnasr, A. A., y Kobisy, A. S. (2015). Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. *Egyptian Journal of Petroleum*, 24(2), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.05.005>
- Gallego, J. L. R., García-Martínez, M. J., Llamas, J. F., Belloch, C., Peláez, A. I., y Sánchez, J. (2007). Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. *Biodegradation*, 18(3), 269–281. <https://doi.org/10.1007/s10532-006-9061-y>
- Ghoreishi, G., Alemzadeh, A., y Mojarrad, M. (2017). Bioremediation capability and characterization of bacteria isolated from petroleum contaminated soils in Iran. *Sustainable Environment Research*, 27(4), 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2017.05.002>
- Giraldo, D., Gutiérrez, S., y Merino, F. (2014). Oil Emulsifying Activity and Removal of Heavy Metals By *Pseudomonas Aeruginosa* Pb 25 Rhamnolipid. *Rev Soc Quím Perú*, 80(1), 35–44.
- Gong, G., Zheng, Z., Chen, H., Yuan, C., Wang, P., Yao, L., y Yu, Z. (2009). Enhanced production of surfactin by *Bacillus subtilis* E8 mutant obtained by ion beam implantation. *Food Technology and Biotechnology*, 47(1), 27–31.
- Grishchenkov, V. G., Townsend, R. T., McDonald, T. J., Autenrieth, R. L., Bonner, J. S., y Boronin, A. M. (2000). Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochemistry*, 35(9), 889–896. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00145-4)
- Haba, E., Bresco, O., Ferrer, C., Marqués, A., Busquets, M., y Manresa, A. (2000). Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(1), 40–44. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00125-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00125-8)
- Hadibarata, T., y Tachibana, S. (2009). Enhanced Chrysene Biodegradation in Presence of a Synthetic Surfactant. *Environmental Research*, (January 2009), 301–308.

- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., y Cappello, S. (2012). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 64(1), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.11.006>
- Hii, Y. S., Law, A. T., Shazili, N. A. M., Abdul-Rashid, M. K., & Lee, C. W. (2009). Biodegradation of Tapis blended crude oil in marine sediment by a consortium of symbiotic bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(2), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.08.003>
- Hina, A., Sana, N., Abdul, M., Muneer, H., Qazi, A., Malik, Z. A., ... Safia, D. (2017). *Isolation and Molecular Characterization of Biosurfactant-Producing Bacterial Diversity of Fimkassar Oil Field , Pakistan*. <https://doi.org/10.1007/s13369-017-2527-x>
- Hua, Z., Chen, Y., Du, G., y Chen, J. (2004). Effects of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on the biodegradation of petroleum compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 25–29. <https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000013287.11561.d4>
- Huang, L., Ma, T., Li, D., Liang, F. lai, Liu, R. L., y Li, G. qiang. (2008). Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. *Marine Pollution Bulletin*, 56(10), 1714–1718. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.07.007>
- Husaini, A., Roslan, H. A., Hii, K. S. Y., y Ang, C. H. (2008). Biodegradation of aliphatic hydrocarbon by indigenous fungi isolated from used motor oil contaminated sites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12), 2789–2797. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9806-3>
- Ibrahim, H. M. M. (2016). Biodegradation of used engine oil by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 isolated from oil-contaminated soil. *3 Biotech*, 6(2), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0540-5>
- Ismail, H., Isa, T., Ngoshe, I. Y., y Gajere, H. M. (2019). *Biosurfactant Production by Bacteria Isolated from Hydrocarbon-impacted soil*. (January), 4–8.
- Ismail, HY, Ijah, U., Riskuwa, M., y Allamin, I. (2014). Biodegradation of spent engine oil by bacteria isolated from the rhizosphere of legumes grown in contaminated soil. *International Journal of Environment*, 3(2), 63–75. <https://doi.org/10.3126/ije.v3i2.10515>
- Jiang, J., Liu, H., Li, Q., Gao, N., Yao, Y., y Xu, H. (2015). Combined remediation of Cd-phenanthrene co-contaminated soil by *Pleurotus cornucopiae* and *Bacillus thuringiensis* FQ1 and the antioxidant responses in *Pleurotus cornucopiae*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.028>
- Joy, S., Rahman, P. K. S. M., y Sharma, S. (2017). Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal*, 317, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.054>
- Kadali, K. K., Simons, K. L., Skuza, P. P., Moore, R. B., y Ball, A. S. (2012). A complementary approach to identifying and assessing the remediation potential of

- hydrocarbonoclastic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 88(3), 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.12.006>
- Kadri, T., Magdouli, S., Rouissi, T., y Brar, S. K. (2018). Ex-situ biodegradation of petroleum hydrocarbons using *Alcanivorax borkumensis* enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, 132, 279–287. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.01.014>
- Karamalidis, A. K., Evangelou, A. C., Karabika, E., Koukkou, A. I., Drainas, C., y Voudrias, E. A. (2010). Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. *Bioresource Technology*, 101(16), 6545–6552. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.055>
- Khan, F. I., Husain, T., y Hejazi, R. (2004). *An overview and analysis of site remediation technologies*. 71, 95–122. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.02.003>
- Koma, D., Sakashita, Y., Kubota, K., Fujii, Y., Hasumi, F., Chung, S. Y., y Kubo, M. (2003). Degradation of Car Engine Base Oil by *Rhodococcus* sp. NDKK48 and *Gordonia* sp. NDKY76A. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(7), 1590–1593. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1590>
- Kosaric, N., y Sukan, F. V. (2015). *BIOSURFACTANTS: Production and Applications Editor Naim KOSAR Fazilet VARDAR-SUKA VOLUME 1: PRODUCTIO* (Vol. 159).
- Kubota, K., Koma, D., Matsumiya, Y., Chung, S. Y., y Kubo, M. (2008). Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. *Biodegradation*, 19(5), 749–757. <https://doi.org/10.1007/s10532-008-9179-1>
- Lee, L. S., Mats, H., Delfino, J. J., Suresh, P., y Raot, C. (1992). Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Diesel Fuel Into Water. *Environmental Science and Technology*, 26(11), 2104–2110. <https://doi.org/10.1021/es00035a005>
- Li, xinfai, Zhao, L., y Adam, M. (2016). Biodegradation of marine crude oil pollution using a salt-tolerant bacterial consortium isolated from Bohai Bay, China. *Marine Pollution Bulletin*, 105(1), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.073>
- Liporace, F., Molina, D., Odobez, N., y Quevedo, C. (2018). Brazilian journal of development BJD. *Brazilian Journal of Development*, 4(6), 2730–2749. Retrieved from <http://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/494/427>
- Liu, B., Ju, M., Liu, J., Wu, W., y Li, X. (2016). Isolation, identification, and crude oil degradation characteristics of a high-temperature, hydrocarbon-degrading strain. *Marine Pollution Bulletin*, 106(1–2), 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.053>
- Liu, Q., Dong, M., Zhou, W., Ayub, M., Zhang, Y. P., y Huang, S. (2004). Improved oil recovery by adsorption-desorption in chemical flooding. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 43(1–2), 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2003.12.017>
- Mansur, A. A., Adetutu, E. M., Kadali, K. K., Morrison, P. D., Nurulita, Y., y Ball, A. S. (2014). Assessing the hydrocarbon degrading potential of indigenous bacteria isolated from crude oil tank bottom sludge and hydrocarbon-contaminated soil of

- Azzawiya oil refinery, Libya. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(18), 10725–10735. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3018-1>
- Mapelli, F., Scoma, A., Michoud, G., Aulenta, F., Boon, N., Borin, S., ... Daffonchio, D. (2017). Biotechnologies for Marine Oil Spill Cleanup: Indissoluble Ties with Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 35(9), 860–870. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.04.003>
- Marchlewicz, A., Domaradzka, D., Guzik, U., y Wojcieszńska, D. (2016). *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) is a Gram-Positive Bacteria Able to Degrade Naproxen and Ibuprofen. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(6), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2893-0>
- Mariano, A. P., Bonotto, D. M., De Angelis, D. D. F., Pirôllo, M. P. S., y Contiero, J. (2008). Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 133–142. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100028>
- Matsui, T., Yamamoto, T., Shinzato, N., Mitsuta, T., Nakano, K., y Namihira, T. (2014). Degradation of oil tank sludge using long-chain alkane-degrading bacteria. *Annals of Microbiology*, 64(1), 391–395. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0643-8>
- Mohanram, R., Jagtap, C., y Kumar, P. (2016). Isolation, screening, and characterization of surface-active agent-producing, oil-degrading marine bacteria of Mumbai Harbor. *Marine Pollution Bulletin*, 105(1), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.040>
- Morikawa, M., Hirata, Y., y Imanaka, T. (2000). A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211–218. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00124-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00124-4)
- Mukherjee, A. K., y Bordoloi, N. K. (2011). Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: A pilot-scale study. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(3), 471–478. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0391-2>
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2), 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>
- Muthukamalam, S., Sivagangavathi, S., Dhrishya, D., y Sudha Rani, S. (2017). Characterization of dioxygenases and biosurfactants produced by crude oil degrading soil bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 637–647. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.007>
- Najafi, A. R., Rahimpour, M. R., Jahanmiri, A. H., Roostaazad, R., Arabian, D., y Ghobadi, Z. (2010). Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. *Chemical Engineering Journal*, 163(3), 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.06.044>
- Narváez Flórez, S., Gómez, M. L., y Martínez, M. M. (2016). Selección De Bacterias Con Capacidad Degradadora De Hidrocarburos Aisladas a Partir De Sedimentos Del Caribe Colombiano. *Bulletin of Marine and Coastal Research*, 37(1), 61–75. <https://doi.org/10.25268/bimc.invenmar.2008.37.1.182>

- Neilson, J. W., Artiola, J. F., y Maier, R. M. (2003). Characterization of lead removal from contaminated soils by nontoxic soil-washing agents. *Journal of Environmental Quality*, 32(3), 899–908. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.8990>
- Oliart-Ros, R. M., Manresa-Presas, Á., y Sánchez-Otero, M. G. (2016). Utilization of microorganisms from extreme environments and their products in biotechnological development. *CienciaUAT*, 11(1), 79–90. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-78582016000200079&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582016000200079&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Otálora, M. F., Peña, J. L., Martínez, M. M., y Varela, A. (2000). Evaluación de la capacidad degradadora de aceite por bacterias lipolíticas en el lodo residual de la extracción de aceite de palma. *Palmas*, 21(1), 283–293.
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., y Deka, S. (2016). Development of an efficient bacterial consortium for the potential remediation of hydrocarbons from contaminated sites. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01092>
- Pérez, I. (2012). Bacillus cereus y su papel en las intoxicaciones alimentarias. *Revista Cubana de Salud Pública*, 38(1), 98–108. <https://doi.org/10.1590/s0864-34662012000100010>
- Pérez, M., Pozo, M., Montes De Oca, J. M., Rodríguez, A., y Cantero, D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC: Ciencias Biológicas*, 39(1), 44–51.
- Pi, Y., Chen, B., Bao, M., Fan, F., Cai, Q., Ze, L., y Zhang, B. (2017). Microbial degradation of four crude oil by biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. *Bioresource Technology*, 232, 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.007>
- Pucci, G., Acuña, A., y Pucci, O. (2015). Biodegradación de hidrocarburos en fondos de tanques de la industria petrolera. *Revista Peruana de Biología*, 22(1), 97–101. <https://doi.org/10.15381/rpb.v22i1.11126>
- Rahman, K. S. M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., y Banat, I. M. (2002). Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology*, 85(3), 257–261. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00119-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00119-0)
- Rampelotto, P. (2013). Extremophiles and Extreme Environments. *Life*, 3(3), 482–485. <https://doi.org/10.3390/life3030482>
- Reyes-Reyes, M. A., Puentes-Cala, E. A., Casanova-Montes, E. L., López-Deluche, F., Panqueva-álvarez, J. H., y Castillo-Villamizar, G. A. (2018). Immobilization of potentially crude oil degrading bacteria in synthetic and natural organic matrices. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(4), 597–609. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.04.04>
- Riojas, H., Torres, L., Mondaca, I., Balderas, J., y Gortáres, P. (2010). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva*, 9(3), 120–145.

- Rontani, J., Bossier-Joulak, F., Rambeloarisoa, E., Bertram, J., & Giusti, G. (1985). Analytical study of abstart crude oil. *Chemosphere*, *11*(103), 1984.
- Rosenberg, E. (1993). Exploiting microbial growth on hydrocarbons - new markets. *Trends in Biotechnology*, Vol. 11, pp. 419–424. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90005-T](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90005-T)
- Saikia, R. R., y Deka, S. (2013). Removal of hydrocarbon from refinery tank bottom sludge employing microbial culture. *Environmental Science and Pollution Research*, *20*(12), 9026–9033. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1888-2>
- Saikia, R. R., Deka, S., Deka, M., y Banat, I. M. (2012). Isolation of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. *Annals of Microbiology*, *62*(2), 753–763. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0315-5>
- Sajna, K. V., Sukumaran, R. K., Gottumukkala, L. D., y Pandey, A. (2015). Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. *Bioresource Technology*, *191*, 133–139. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.04.126>
- Sarkar, P., Roy, A., Pal, S., Mohapatra, B., Kazy, S. K., Maiti, M. K., y Sar, P. (2017). Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. *Bioresource Technology*, *242*, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.010>
- Sarma, Aniruddha; Sarma, H. (2010). Enhanced Biodegradation of Oil Products by Some Microbial Isolate Supplemented with Heavy Metals. *International Journal of Botany*, *4*(1811–9700), 441–448. <https://doi.org/10.3923/ijb.2010.441.448>
- Sarubbo, L. A. (2006). *Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of Candida glabrata UCP 1002*. *9*(4). <https://doi.org/10.2225/vol9-issue4-fulltext-6>
- Shetaia, Y. M. H., El Khalik, W. A. A., Mohamed, T. M., Farahat, L. A., y ElMekawy, A. (2016). Potential biodegradation of crude petroleum oil by newly isolated halotolerant microbial strains from polluted Red Sea area. *Marine Pollution Bulletin*, *111*(1–2), 435–442. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.035>
- Stan, C., Andreescu, C., Afonso, P., y Wernke, R. (2018). Some aspects of the regeneration of used motor oil Some aspects of regeneration motor a of used Costing models for capacity optimization in Industry Santana. *ScienceDirect*, *22*, 709–713. <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2018.03.102>
- Su, W. T., Wu, B. S., y Chen, W. J. (2011). Characterization and biodegradation of motor oil by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* and optimizing medium constituents. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *42*(5), 689–695. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2011.01.002>
- Suja, F., Rahim, F., Taha, M. R., Hambali, N., Razali, R. M., Khalid, A., y Hamzah, A. (2014). Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *90*, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.006>

- Tang, J. C., Wang, R. G., Niu, X. W., Wang, M., Chu, H. R., y Zhou, Q. X. (2010). Characterisation of the rhizoremediation of petroleum-contaminated soil: Effect of different influencing factors. *Biogeosciences*, 7(12), 3961–3969. <https://doi.org/10.5194/bg-7-3961-2010>
- Tao, K., Liu, X., Chen, X., Hu, X., Cao, L., y Yuan, X. (2017). Biodegradation of crude oil by a defined co-culture of indigenous bacterial consortium and exogenous *Bacillus subtilis*. *Bioresource Technology*, 224, 327–332. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.073>
- Thamer, M., Al-Kubaisi, A. R., Zahraw, Z., Abdullah, H. A., Hindy, I., y Khadium, A. A. (2013). Biodegradation of Kirkuk light crude oil by *Bacillus thuringiensis* Northern of Iraq. *Natural Science*, 05(07), 865–873. <https://doi.org/10.4236/ns.2013.57104>
- Tiehm, A. (1994). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), 258–263. <https://doi.org/10.1007/BF02533257>
- Torres, L. G., Orantes, J. L., y Iturbe, R. (2003). Critical micellar concentrations for three surfactants and their diesel-removal efficiencies in petroleum-contaminated soils. *Environmental Geosciences*, 10(1), 28–36. <https://doi.org/10.1306/eg100102008>
- Torres, L. G., Rojas, N., Bautista, G., y Iturbe, R. (2005). Effect of temperature, and surfactant's HLB and dose over the TPH-diesel biodegradation process in aged soils. *Process Biochemistry*, 40(10), 3296–3302. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.032>
- Torres, O. D., y Velho, L. (2010). La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. *Ciência Da Informação*, 38(3), 96–110. <https://doi.org/10.1590/s0100-19652009000300007>
- Udeani, T. K. C., Obroh, A. A., Okwuosa, C. N., Achukwu, P. U., y Azubike, N. (2009). Isolation of bacteria from mechanic workshops' soil environment contaminated with used engine oil. *African Journal of Biotechnology*, 8(22), 6301–6303.
- Varela, A. (2000). *Aceite por bacterias lipolíticas en el lodo residual de la extracción de aceite de palma Evaluation of the oil degradation capacity of lipolytic bacteria in the residual sludge of the oil palm extraction*. 21.
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, Vol. 223, pp. 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- Varjani, S. J., y Upasani, V. N. (2016). Bioresource Technology Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource Technology*, 222, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.006>
- Varjani, S. J., y Upasani, V. N. (2017). A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 120, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.006>
- Venkateswaran, K., Hoaki, T., Kato, M., y Maruyama, T. (1995). Microbial degradation of resins fractionated from Arabian light crude oil. *Canadian Journal of*

*Microbiology*, 41(4–5), 418–424. <https://doi.org/10.1139/m95-055>

- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., Piotrowska-Seget, Z., y Radecka, I. K. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express*, 1(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-11>
- Verma, S., Bhargava, R., y Pruthi, V. (2006). Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 57(4), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.02.004>
- Vieira Santos, V., Silveira, E., y Barbosa, B. (2019). Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 21(6–8), 382–399. <https://doi.org/10.1080/10937404.2018.1564712>
- Volkering, F., Breure, A. M., y Rulkens, W. H. (1997). Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*, 8(6), 401–417. <https://doi.org/10.1023/A:1008291130109>
- Wadekar, S. D., Kale, S. B., Lali, A. M., Bhowmick, D. N., y Pratap, A. P. (2012). Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42(3), 249–266. <https://doi.org/10.1080/10826068.2011.603000>
- Walker, J. D., Petrakis, L., y Colwell, R. R. (1976). Comparison of the biodegradability of crude and fuel oils. *Canadian Journal of Microbiology*, 22(4), 598–602. <https://doi.org/10.1139/m76-089>
- Walter, V., Syltatk, C., y Hausmann, R. (2010). *Biosurfactants* (S. Ramkrishna, Ed.).
- Wolińska, A., Kuźniar, A., Szafranek-Nakonieczna, A., Jastrzębska, N., Roguska, E., y Stępniewska, Z. (2016). Biological activity of autochthonic bacterial community in oil-contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(5). <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2825-z>
- Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., y Okuyama, H. (2004). Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Current Microbiology*, 49(6), 415–422. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4347-y>
- Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., ... Chen, L. (2016). Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 107, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.019>
- Xia, W. J., Luo, Z. Bin, Dong, H. P., Yu, L., Cui, Q. F., y Bi, Y. Q. (2012). Synthesis, characterization, and oil recovery application of biosurfactant produced by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* WJ-1 using waste vegetable oils. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(5), 1148–1166. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9501-y>
- Yu, H., y Huang, G. H. (2011). Isolation and characterization of biosurfactant-and bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites in Western

- Canada. *Soil and Sediment Contamination*, 20(3), 274–288.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.020>
- Yuan, X., Zhang, X., Chen, X., Kong, D., Liu, X., y Shen, S. (2018). Synergistic degradation of crude oil by indigenous bacterial consortium and exogenous fungus *Scedosporium boydii*. *Bioresource Technology*, 264(April), 190–197.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.072>
- Zhang, H., Dang, Z., Zheng, L. C., y Yi, X. Y. (2009). Remediation of soil co-contaminated with pyrene and cadmium by growing maize (*Zea mays* L.). *International Journal of Environmental Science and Technology*, 6(2), 249–258.  
<https://doi.org/10.1007/BF03327629>
- Zhang, X., Xu, D., Zhu, C., Lundaa, T., y Scherr, K. E. (2012). Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Chemical Engineering Journal*, 209, 138–146.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.07.110>

## ANEXOS

### Anexo 1. Ubicación del sitio de muestreo



Anexo 2. Datos de la medida de la absorbancia de los cultivos

| Dilución<br>( $\mu$ l/ml) | Absorbancia (nm) |      |      |       |      |      |       |      |      |       |      |      |       |      |      |
|---------------------------|------------------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|
|                           | Día 1            |      |      | Día 2 |      |      | Día 3 |      |      | Día 4 |      |      | Día 5 |      |      |
|                           | R1               | R2   | R3   | R1    | R2   | R3   | R1    | R2   | R3   | R1    | R2   | R3   | R1    | R2   | R3   |
| 0.1                       | 2.37             | 2.21 | 2.29 | 2.50  | 2.15 | 2.38 | 2.14  | 2.04 | 2.21 | 1.27  | 1.52 | 1.57 | 2.20  | 2.33 | 2.48 |
| 0.01                      | 1.12             | 0.98 | 1.04 | 1.09  | 0.92 | 1.02 | 0.96  | 0.85 | 0.91 | 0.93  | 0.81 | 0.87 | 1.29  | 1.20 | 1.15 |
| 0.001                     | 0.26             | 0.25 | 0.27 | 0.19  | 0.15 | 0.17 | 0.24  | 0.22 | 0.26 | 0.11  | 0.14 | 0.14 | 0.26  | 0.27 | 0.34 |
| 0.0001                    | 0.08             | 0.05 | 0.04 | 0.11  | 0.11 | 0.10 | 0.11  | 0.11 | 0.12 | 0.11  | 0.11 | 0.11 | 0.17  | 0.16 | 0.19 |

Anexo 3. Datos del número de UFC de los cultivos

| Dilución<br>( $\mu$ l/ml) | Unidades formadoras de colonia (UFC) |    |     |       |    |    |       |     |     |       |    |     |       |     |     |
|---------------------------|--------------------------------------|----|-----|-------|----|----|-------|-----|-----|-------|----|-----|-------|-----|-----|
|                           | Día 1                                |    |     | Día 2 |    |    | Día 3 |     |     | Día 4 |    |     | Día 5 |     |     |
|                           | R1                                   | R2 | R3  | R1    | R2 | R3 | R1    | R2  | R3  | R1    | R2 | R3  | R1    | R2  | R3  |
| 0.1                       | 0                                    | 0  | 0   | 100   | 0  | 0  | 0     | 100 | 100 | 0     | 0  | 0   | 0     | 0   | 100 |
| 0.01                      | 100                                  | 0  | 0   | 400   | 0  | 0  | 0     | 0   | 0   | 0     | 0  | 200 | 100   | 100 | 200 |
| 0.001                     | 0                                    | 0  | 100 | 0     | 0  | 0  | 0     | 0   | 0   | 0     | 0  | 0   | 0     | 0   | 200 |
| 0.0001                    | 0                                    | 0  | 100 | 0     | 0  | 0  | 0     | 0   | 100 | 0     | 0  | 0   | 0     | 0   | 200 |

Anexo 4. Pruebas de normalidad para la absorbancia

|                                   | Pruebas de normalidad           |    |      |              |    |      |
|-----------------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|                                   | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|                                   | Estadístico                     | gl | Sig. | Estadístico  | gl | Sig. |
| Residuo para<br>Raiz_absorbancia* | .110                            | 60 | .069 | .963         | 60 | .065 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

\*Se realiza la prueba de normalidad con los datos de la absorbancia transformados

Anexo 5. Análisis de la varianza para la absorbancia de los cultivos

| Pruebas de efectos inter-sujetos |                   |          |      |
|----------------------------------|-------------------|----------|------|
| Variable dependiente:            | Raiz_absorbancia* |          |      |
| Origen                           | gl                | F        | Sig. |
| Concentración                    | 3                 | 3949.468 | .000 |
| Día                              | 4                 | 53.994   | .000 |
| Concentración<br>* Día           | 12                | 14.939   | .000 |
| Repetición                       | 2                 | 4.004    | .026 |
| Error                            | 38                |          |      |
| Total<br>corregido               | 59                |          |      |

a. R al cuadrado = .997 (R al cuadrado ajustada = .995)

\* ANOVA con los datos de la absorbancia transformados

Anexo 6. Resultados de la prueba de Tukey para la absorbancia

**HSD Tukey<sup>a,b</sup>**

| Concentración (ul/ml) | N  | Medias  | Subconjunto |       |       |  |
|-----------------------|----|---------|-------------|-------|-------|--|
| 0.0001 ul/ml          | 15 | 3.2926  | A           |       |       |  |
| 0.001 ul/ml           | 15 | 4.6176  | B           |       |       |  |
| 0.01 ul/ml            | 15 | 10.0251 | C           |       |       |  |
| 0.1 ul/ml             | 15 | 14.4697 | D           |       |       |  |
| Sig.                  |    | 1.000   | 1.000       | 1.000 | 1.000 |  |

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .101.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15.000.

b. Alfa = .05.

Anexo 7. Datos de la prueba de desplazamiento

|          | Halo de desplazamiento |       |       |              |      |      |              |      |      |                  |       |       |
|----------|------------------------|-------|-------|--------------|------|------|--------------|------|------|------------------|-------|-------|
|          | Diésel                 |       |       | Aceite usado |      |      | Aceite nuevo |      |      | Petróleo liviano |       |       |
| Aislados | R1                     | R2    | R3    | R1           | R2   | R3   | R1           | R2   | R3   | R1               | R2    | R3    |
| BR1Pb-3  | 12.82                  | 11.88 | 12.6  | 6.4          | 5.61 | 5.23 | 3.77         | 2.06 | 3.2  | 12.77            | 9.48  | 8.69  |
| BR1Pb-4  | 47.09                  | 45.64 | 47.66 | 5.16         | 4.51 | 5.06 | 4.31         | 3.36 | 3.3  | 5.73             | 5.89  | 8.87  |
| DR3Pe-1  | 39.19                  | 45.43 | 42.78 | 3.85         | 3.01 | 3.53 | 4.84         | 3.41 | 3.64 | 10.27            | 12.74 | 11.21 |
| Mezcla   | 39.09                  | 41.22 | 41.47 | 4.92         | 4.69 | 4.88 | 10.04        | 8.14 | 8.58 | 13.09            | 12.37 | 11.33 |

Anexo 8. Datos de las medias de la prueba de desplazamiento

|         | Halo de desplazamiento |              |              |                  |  |
|---------|------------------------|--------------|--------------|------------------|--|
|         | Diésel                 | Aceite usado | Aceite nuevo | Petróleo liviano |  |
| BR1Pb-3 | 12.43                  | 5.75         | 3.01         | 10.31            |  |
| BR1Pb-4 | 46.80                  | 4.91         | 3.66         | 6.83             |  |
| DR3Pe-1 | 42.47                  | 3.46         | 3.96         | 11.41            |  |
| Mezcla  | 40.59                  | 4.83         | 8.92         | 12.26            |  |

Anexo 9. Datos de la prueba de emulsificación

|          | Prueba de emulsificación (E24) |      |      |              |       |       |              |       |       |                  |       |       |
|----------|--------------------------------|------|------|--------------|-------|-------|--------------|-------|-------|------------------|-------|-------|
|          | Diésel                         |      |      | Aceite usado |       |       | Aceite nuevo |       |       | Petróleo liviano |       |       |
| Aislados | R1                             | R2   | R3   | R1           | R2    | R3    | R1           | R2    | R3    | R1               | R2    | R3    |
| BR1Pb-3  | 3.20                           | 2.47 | 2.05 | 47.82        | 51.18 | 54.70 | 74.56        | 73.55 | 70.33 | 95.63            | 96.13 | 96.40 |
| BR1Pb-4  | 4.38                           | 3.55 | 2.92 | 31.77        | 46.90 | 47.86 | 79.95        | 79.96 | 83.88 | 80.73            | 78.68 | 80.85 |
| DR3Pe-1  | 3.53                           | 5.12 | 4.98 | 41.67        | 51.02 | 42.82 | 73.53        | 74.85 | 77.13 | 79.52            | 78.38 | 70.70 |
| Mezcla   | 4.85                           | 6.51 | 5.20 | 72.76        | 64.50 | 65.62 | 89.16        | 85.56 | 89.30 | 96.25            | 96.54 | 97.21 |

Anexo 10. Datos de las medias de la prueba de emulsificación

| <b>Prueba de emulsificación (E24)</b> |               |                     |                     |                         |
|---------------------------------------|---------------|---------------------|---------------------|-------------------------|
| <b>Aislados</b>                       | <b>Diésel</b> | <b>Aceite usado</b> | <b>Aceite nuevo</b> | <b>Petróleo liviano</b> |
| BR1Pb-3                               | 2.57          | 51.23               | 72.81               | 96.06                   |
| BR1Pb-4                               | 3.62          | 42.18               | 81.26               | 80.09                   |
| DR3Pe-1                               | 4.54          | 45.17               | 75.17               | 76.20                   |
| Mezcla                                | 5.52          | 67.63               | 88.01               | 96.67                   |

Anexo 11. Pruebas de normalidad para la prueba de desplazamiento

|                            | <b>Pruebas de normalidad</b>          |           |             |                     |           |             |
|----------------------------|---------------------------------------|-----------|-------------|---------------------|-----------|-------------|
|                            | <b>Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup></b> |           |             | <b>Shapiro-Wilk</b> |           |             |
|                            | <b>Estadístico</b>                    | <b>gl</b> | <b>Sig.</b> | <b>Estadístico</b>  | <b>gl</b> | <b>Sig.</b> |
| Residuo para<br>Log_halo** | .097                                  | 48        | ,200*       | .983                | 48        | .701        |

\*Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

\*\*Datos transformados de la prueba de halo de desplazamiento

a. Corrección de significación de Lilliefors

Anexo 12. Pruebas de normalidad para la prueba del porcentaje de emulsificación (E24)

|                             | <b>Pruebas de normalidad</b>          |           |             |                     |           |             |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------|-------------|---------------------|-----------|-------------|
|                             | <b>Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup></b> |           |             | <b>Shapiro-Wilk</b> |           |             |
|                             | <b>Estadístico</b>                    | <b>gl</b> | <b>Sig.</b> | <b>Estadístico</b>  | <b>gl</b> | <b>Sig.</b> |
| Residuo para<br>ARSIN_E24** | .106                                  | 48        | ,200*       | .970                | 48        | .246        |

\*Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

\*\*Datos transformados de la prueba de emulsificación E<sub>24</sub>

a. Corrección de significación de Lilliefors

Anexo 13. Análisis de la varianza para ambas pruebas de degradación de hidrocarburo (Prueba de desplazamiento y Porcentaje de emulsificación E<sub>24</sub>)

**Pruebas de efectos inter-sujetos**

| Variable dependiente: | Log_halo* |          |             | Variable dependiente: | ARSIN_E24** |             |
|-----------------------|-----------|----------|-------------|-----------------------|-------------|-------------|
| <b>Origen</b>         | <b>gl</b> | <b>F</b> | <b>Sig.</b> | <b>gl</b>             | <b>F</b>    | <b>Sig.</b> |
| Aislado               | 3         | 38.453   | .000        | 3                     | 68.762      | .000        |
| Hidrocarburo          | 3         | 580.196  | .000        | 3                     | 1326.281    | .000        |
| Repetición            | 2         | 3.541    | .042        | 2                     | .217        | .806        |
| Aislado *             |           |          |             |                       |             |             |
| Hidrocarburo          | 9         | 29.838   | .000        | 9                     | 21.092      | .000        |
| Error                 | 30        |          |             | 30                    |             |             |
| Total corregido       | 47        |          |             | 47                    |             |             |

a. R al cuadrado = .986 (R al cuadrado ajustada = .978)

a. R al cuadrado = .993 (R al cuadrado ajustada = .989)

\*Datos transformados de la prueba de halo de desplazamiento

\*\*Datos transformados de la prueba de emulsificación E<sub>24</sub>

Anexo 14. Resultados de la prueba de Tukey para la prueba de desplazamiento

**HSD Tukey<sup>a,b</sup>**

| Microorganismo | Tipo de Hidrocarburo | Media* | Subconjuntos |
|----------------|----------------------|--------|--------------|
| BR1Pb-4        | Diesel               | 46.80  | A            |
| DR3Pe-1        | Diesel               | 42.47  | A            |
| Mezcla         | Diesel               | 40.59  | A            |
| BR1Pb-3        | Diesel               | 12.43  | B            |
| Mezcla         | Petróleo liviano     | 12.26  | B            |
| DR3Pe-1        | Petróleo liviano     | 11.41  | B            |
| BR1Pb-3        | Petróleo liviano     | 10.31  | B            |
| Mezcla         | Aceite nuevo         | 8.92   | B C          |
| BR1Pb-4        | Petróleo liviano     | 6.83   | C D          |
| BR1Pb-3        | Aceite usado         | 5.75   | D E          |
| BR1Pb-4        | Aceite usado         | 4.91   | D E F        |
| Mezcla         | Aceite usado         | 4.83   | D E E        |
| DR3Pe-1        | Aceite nuevo         | 3.96   | E F G        |
| BR1Pb-4        | Aceite nuevo         | 3.66   | F G          |
| DR3Pe-1        | Aceite usado         | 3.46   | F G          |
| BR1Pb-3        | Aceite nuevo         | 3.01   | G            |

\*Media de los datos sin transformar

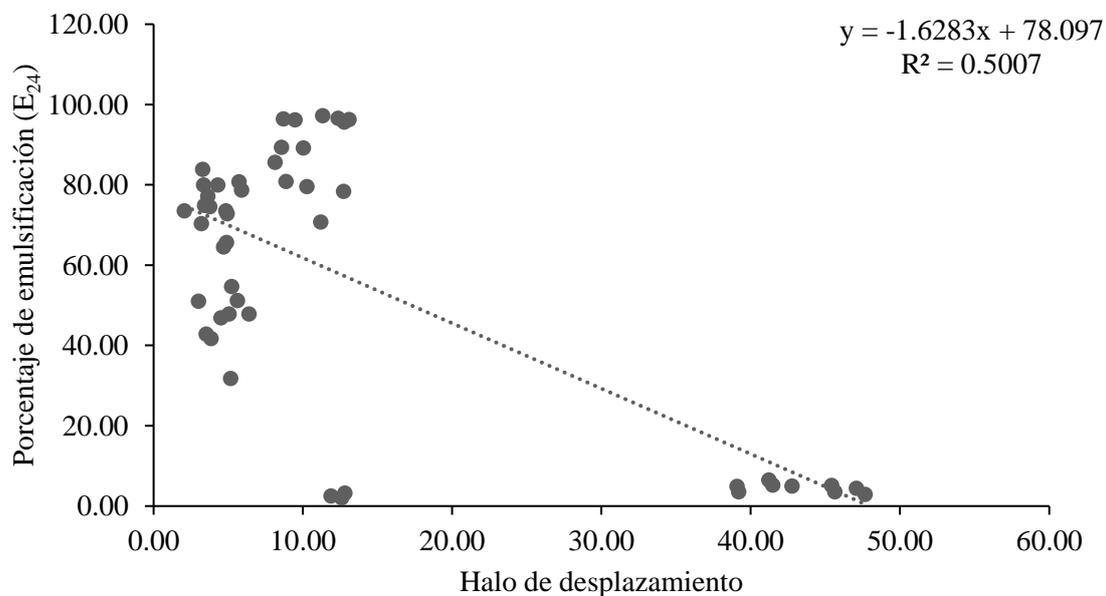
Anexo 15. Resultados de la prueba de Tukey para la prueba de porcentaje de emulsificación E<sub>24</sub>

**HSD Tukey<sup>a,b</sup>**

| Microorganismo | Tipo de Hidrocarburo | Media* | Subconjuntos |
|----------------|----------------------|--------|--------------|
| Mezcla         | Petróleo liviano     | 96.67  | A            |
| BR1Pb-3        | Petróleo liviano     | 96.06  | A            |
| Mezcla         | Aceite nuevo         | 88.01  | B            |
| BR1Pb-4        | Aceite nuevo         | 81.26  | B C          |
| BR1Pb-4        | Petróleo liviano     | 80.09  | C            |
| DR3Pe-1        | Petróleo liviano     | 76.20  | C D          |
| DR3Pe-1        | Aceite nuevo         | 75.17  | C D          |
| BR1Pb-3        | Aceite nuevo         | 72.81  | C D          |
| Mezcla         | Aceite usado         | 67.63  | D            |
| BR1Pb-3        | Aceite usado         | 51.23  | E            |
| DR3Pe-1        | Aceite usado         | 45.17  | E            |
| BR1Pb-4        | Aceite usado         | 42.18  | E            |
| Mezcla         | Diesel               | 5.52   | F            |
| DR3Pe-1        | Diesel               | 4.54   | F            |
| BR1Pb-4        | Diesel               | 3.62   | F            |
| BR1Pb-3        | Diesel               | 2.57   | F            |

\*Media de los datos sin transformar

Anexo 16. Correlación de las pruebas de degradación



Anexo 17. Observación de los amplicones obtenidos de la PCR del marcador molecular 16s en gel de electroforesis al 2%

