

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**TESIS**

**DETERMINACIÓN DE BACTERIAS HETERÓTROFAS EN SUELOS  
CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS Y SU CAPACIDAD DE TOLERAR  
CONCENTRACIONES CRECIENTES DE PETRÓLEO *in vitro***

**PRESENTADO POR:**

**Br. JUAN SILAS CCANCCE AYAMAMANI**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PUNO PERÚ**

**2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**DETERMINACIÓN DE BACTERIAS HETERÓTROFAS EN SUELOS  
CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS Y SU CAPACIDAD DE TOLERAR  
CONCENTRACIONES CRECIENTES DE PETRÓLEO *in vitro***

**TESIS**

**PRESENTADO POR:**

**Br. JUAN SILAS CCANCCE AYAMAMANI**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:**

**PRESIDENTE**

.....  
Mg. Martha Elizabeth Aparicio Saavedra

**PRIMER MIEMBRO**

.....  
Blgo. Herminio René Alfaro Tapia

**SEGUNDO MIEMBRO**

.....  
Mg. María Isabel Vallenás Gaona

**DIRECTOR / ASESOR**

.....  
Dr. Sc. Juan José Pauro Roque

**Fecha de sustentación: 30 de noviembre del 2018.**

**Área:** Ciencias Biomédicas.

**Sub línea:** Biotecnología Vegetal, Ambiental y Humana.

**Tema:** Biotecnología Microbiana.

## DEDICATORIA

A Dios por darme fuerza y fortaleza de seguir adelante a pesar de las adversidades.

Dedico a mi familia, esposa e hijos por su apoyo constante en lograr una meta y los tendré siempre presentes.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, a la Facultad de Ciencias Biológicas y sus laboratorios, que me brindaron su formación y apoyo para lograr el objetivo.

Agradezco a mi familia por tener esa confianza en mí en lograr una meta.

Agradezco a mi asesor por guiarme en este trabajo el cual permitió cumplir el objetivo que me he planteado.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS .....	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
I. INTRODUCCIÓN .....	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	15
2.1 ANTECEDENTES .....	15
2.2 MARCO TEÓRICO.....	17
2.2.1 Hidrocarburos .....	17
2.2.2 Contaminación ambiental por hidrocarburos .....	17
2.2.3 Biodegradación del petróleo.....	19
2.2.4 Bacterias heterótrofas .....	21
2.2.5 Bacterias degradadoras de hidrocarburos.....	23
2.2.6 Biorremediación.....	24
2.2.7 Mecanismos genéticos y fisicoquímicos .....	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
3.1 TAMAÑO DE MUESTRA .....	32
3.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO .....	32
3.3 CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA DE BACTERIAS HETERÓTROFAS EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS .....	32
3.4 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE BACTERIAS <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> Y <i>Bacillus</i> sp EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS .....	35
3.5 EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA <i>in vitro</i> DE LAS BACTERIAS EN CONCENTRACIONES CRECIENTES DE PETRÓLEO .....	36
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
4.1 RECUENTO DE BACTERIAS HETERÓTROFAS EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS .....	41
4.2 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> Y <i>Bacillus</i> sp EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS .....	45
4.3 TOLERANCIA <i>in vitro</i> DE BACTERIAS AISLADAS EN CONCENTRACIONES CRECIENTES DE PETRÓLEO .....	48

V. CONCLUSIONES .....	53
VI. RECOMENDACIONES .....	54
VII. REFERENCIAS.....	55
ANEXOS.....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa genético del Operón tod de <i>Pseudomonas putida</i> KL47 (Lee et al., 2006). .....	30
<b>Figura 2.</b> Regulación catabólica en presencia de xileno (González et al., 2004). .....	31
<b>Figura 3.</b> Esquema de reparación de muestras y diluciones.....	33
<b>Figura 4.</b> Esquema de preparación de diluciones para recuento bacteriano.....	33
<b>Figura 5.</b> Cultivo por extensión con asa Digrafsky para recuento bacteriano, laboratorio de Ecología, julio – octubre 2018. ....	34
<b>Figura 6.</b> Materiales utilizados para la identificación de bacterias, laboratorio de Ecología, setiembre – octubre 2018.....	35
<b>Figura 7.</b> Medios de cultivo preparados para la identificación bacteriana, laboratorio de Ecología, julio – octubre 2018 (de izquierda a derecha: SIM, manitol salado, <i>Pseudomonas</i> , EMB y TSA). .....	36
<b>Figura 8.</b> Láminas de tinción Gram de bacterias aisladas de tierra de talleres de mecánica, laboratorio de Microbiología – FCCBB, julio – agosto 2018.....	36
<b>Figura 9.</b> Preparación de medios de cultivo con concentraciones crecientes de petróleo, laboratorio de Ecología – FCCBB, julio – agosto 2017. ....	37
<b>Figura 10.</b> Plaqueado de medios de cultivo con concentraciones crecientes de petróleo, laboratorio de Ecología – FCCBB, julio – agosto 2017. ....	37
<b>Figura 11.</b> Preparación de solución salina de bacterias para cultivo por extensión a una concentración de $1.5 \times 10^8$ UFC/ml (estándar McFarland N° 0.5), laboratorio de Ecología – FCCBB, setiembre – octubre 2017. ....	38
<b>Figura 12.</b> Transferencia de 1 ml de dilución bacteriana en plagas con medio TSA con concentraciones crecientes de petróleo, laboratorio de Ecología – FCCBB, setiembre – octubre 2017. ....	38
<b>Figura 13.</b> Cultivo por extensión de las diluciones bacterianas mediante el asa de Digrafsky en agar TSA con diferentes concentraciones de petróleo, laboratorio de Ecología – FCCBB, setiembre – octubre 2017.....	39
<b>Figura 14.</b> Placas de agar TSA con diferentes concentraciones de petróleo y bacterias cultivadas por extensión, laboratorio de Ecología – FCCBB, setiembre – octubre 2017. ....	39
<b>Figura 15.</b> Recuento de bacterias heterótrofas en agar APC en suelos de tres talleres de la ciudad de Puno, julio - agosto 2017. ....	41
<b>Figura 16.</b> Prueba de Tukey de los recuentos de bacterias heterótrofas en suelos de tres talleres de la ciudad de Puno, julio – agosto 2017. ....	42

- Figura 17.** Reacciones bioquímicas de bacterias *Pseudomonas* sp en Agar *Pseudomonas* y tinción Gram, laboratorio de Ecología – FCCBB, julio – agosto 2018. ....45
- Figura 18.** Reacciones bioquímicas de bacterias *Alcaligenes* sp en Agar Citrato, MacConkey, prueba de catalasa y tinción Gram, laboratorio de Ecología – FCCBB, julio – octubre 2018. .... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 19.** Reacciones bioquímicas de bacterias *Bacillus* sp en Agar MacConkey, Citrato Simons, reacción de Indol, tinción Gram y prueba de la catalasa, laboratorio de Ecología – FCCBB, julio – agosto 2018. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 20.** Crecimiento de colonias bacterianas a 0.1% (izquierdo), 0.5% (centro) y 1% (derecha) de petróleo en agar TSA, laboratorio de Ecología – FCCBB, setiembre – octubre 2017. ....49
- Figura 21.** Prueba de Tukey del recuento de colonias de tres bacterias aisladas según concentración en el medio de cultivo, laboratorio de Ecología – FCCBB, setiembre – octubre 2017. ....50
- Figura 22.** Análisis de varianza de los recuentos de colonias bacterianas (UFC/g de suelo) según los talleres de mecánica automotriz. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 23.** Análisis factorial 3 x 3 de los recuentos de colonias bacterianas según tres bacterias aisladas y las tres concentraciones de petróleo experimentadas..... **¡Error! Marcador no definido.**



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución de muestras por zonas y meses de muestreo. ....	32
<b>Tabla 2.</b> Recuento de bacterias heterotróficas ( $\times 10^4$ UFC/g) de suelos de tres talleres contaminados con hidrocarburos de la ciudad de Puno, julio – agosto 2017. 41	
<b>Tabla 3.</b> Recuento de colonias bacterianas en medio TSA conteniendo 0.1%, 0.5% y 1% de petróleo a partir de una solución de $1.5 \times 10^8$ UFC/ml, laboratorio de Ecología – FCCBB, setiembre – octubre 2017.....	48

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

°C = grados centígrados

CS = Citrato Simmons

EMB = Eosin Metil Blue

*et al.* = y colaboradores

F = Valor Fisher calculada

FCCBB = Facultad de Ciencias Biológicas

g = gramos

gl = grados de libertad

HTP = Hidrocarburos totales de petróleo

ml = mililitro

mm = milímetros

MS = Manitol Salado

n = tamaño de muestra

No = número

P = valor de la probabilidad del software Infostat

Rep = repetición

spp = especies

UNA – P = Universidad Nacional del Altiplano – Puno

UFC / g = unidades formadoras de colonia por g de suelo

## RESUMEN

Los objetivos de la investigación fueron: a) Cuantificar la carga de bacterias heterótrofas en suelos contaminados con hidrocarburos procedentes de los talleres de mecánica automotriz de la ciudad de Puno, b) Determinar la presencia de bacterias *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Bacillus* sp en suelos contaminados con hidrocarburos y c) Evaluar la tolerancia *in vitro* de las bacterias aisladas en concentraciones crecientes de petróleo (0.1, 0.5 y 1%). Las muestras procedieron de tres talleres de la Av. Simón Bolívar de la ciudad de Puno, y los experimentos se realizaron en el laboratorio de Ecología de la FCCBB de la UNA – P. Metodología: se recolectaron muestras de suelos de los talleres de mecánica automotriz, estos pasaron a una etapa de pre – enriquecimiento, seguidamente se realizó la cuantificación de la carga de bacterias heterótrofas a partir de diluciones mediante el método de superficie con asa de Digrafsky. A continuación, se realizaron la identificación bacteriana mediante la caracterización de colonias, cultivo en agar Citrato, Pseudomonas, Indol, MacConkey, coloración Gram y catalasa. La prueba de la tolerancia al petróleo *in vitro* se realizó mediante el método de recuento en placa Petri. Los recuentos *in vitro* de las bacterias heterotróficas en muestras de suelos de los talleres de mecánica, oscilaron entre 197 y 220 UFC/g de suelo en el taller 1, entre 251 y 289 UFC/g de suelo en el taller 2 y de 127 y 220 UFC/g de suelo en el taller 3. Las bacterias aisladas a partir de suelos contaminados con hidrocarburos de los talleres de mecánica automotriz fueron de los géneros *Pseudomonas* sp *Alcaligenes* sp y *Bacillus* sp de acuerdo a sus características de cultivo y bioquímicas y las bacterias del género *Alcaligenes* sp fueron las que toleraron las tres concentraciones experimentadas, las otras dos bacterias disminuyeron su recuento de colonias al incrementar la concentración de petróleo en el medio.

**Palabras clave:** Bacterias heterotróficas, hidrocarburos, petróleo, Pseudomonas, tolerancia microbiana.

### ABSTRACT

The objectives of the research were: a) to quantify the load of heterotrophic bacteria in soils contaminated with hydrocarbons from auto mechanic workshops in the city of Puno, b) to determine the presence of *Pseudomonas*, *Alcaligenes* and *Bacillus* sp bacteria in soils contaminated with hydrocarbons and c) evaluate the in vitro tolerance of bacteria isolated in increasing concentrations of oil (0.1, 0.5 and 1%). The samples came from three workshops of Av. Simón Bolívar in the city of Puno, and the experiments were carried out in the Ecology laboratory of the FCCBB of UNA - P. Methodology: Soil samples from automotive mechanics workshops were collected, they were passed to a pre-enrichment stage, then the quantification of the heterotrophic bacteria load was made from dilutions using the Digrafsky loop surface method. Next, bacterial identification was performed by characterization of colonies, culture on Citrate agar, *Pseudomonas*, Indol, MacConkey, Gram stain and catalase. The in vitro oil tolerance test was performed by the Petri dish counting method. The results were: The in vitro counts of the heterotrophic bacteria in floor samples from the mechanics workshops ranged between 197 and 220 CFU/g of soil in workshop 1, between 251 and 289 CFU/g of soil in workshop 2 and 127 and 220 CFU/g of soil in the workshop 3. Bacteria isolated from soils contaminated with hydrocarbons from auto mechanic workshops were of the genera *Pseudomonas* sp *Alcaligenes* sp and *Bacillus* sp according to their characteristics, cultures and biochemistry and the bacteria of the genus *Alcaligenes* sp were those that tolerated the three concentrations experienced, the other two bacteria decreased their colony count by increasing the concentration of oil in the medium.

**Key words:** Heterotrophic bacteria, hydrocarbons, petroleum, *Pseudomonas*, microbial tolerance.

## I. INTRODUCCIÓN

En las ciudades de la región Puno, la contaminación por HTP en los suelos de los talleres de mecánica automotriz con petróleo, gasolina, aceites, lubricantes, entre otros, son un claro ejemplo del efecto que originan dichos compuestos químicos en los ecosistemas edáficos; por otro lado, en los alrededores de las zonas de explotación del petróleo, en el caso del Perú, se ha sufrido uno de los derrames de crudo de petróleo más severos en la selva de la región Loreto, originando impactos negativos en la flora, la fauna y las fuentes de agua de esa región, la región Puno, posee el caso de la localidad de Pirin, en el que las perforaciones de pozos petroleros, trajeron la emisión de contaminantes originando daños en los ecosistemas de la zona.

Ante esta realidad, las bacterias son muy importantes, pues tienen la capacidad de transformar una gran variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos a sustancias inocuas, que pueden ser reciclados al medio ambiente y también de aquellas bacterias que tienen la capacidad de oxidar una gran cantidad de compuestos orgánicos producidos y utilizados industrialmente (Rittmann, 2001), entre las bacterias se mencionan a los géneros *Pseudomonas*, que son capaces de colonizar un amplio rango de nichos, siendo aislado tanto en suelos limpios como en suelos contaminados por productos biogénicos y xenobióticos, también son microbiota predominante en la rizósfera y en la filósfera de plantas; del mismo modo, se han aislado de ambientes acuáticos, tanto de agua dulce como de aguas marinas (Llenque, 2011).

La biodegradación de hidrocarburos en suelos, es una alternativa que puede emplearse tanto para el tratamiento, como para la disposición final de los residuos producidos por las refinерías del petróleo. Las bacterias requieren de una amplia área de contacto entre ellas y el petróleo, para llevar a cabo, la emulsificación del petróleo en el medio acuoso circundante (Morris, 1997), por lo que en esta investigación se plantea evaluar la primera etapa de una serie de investigaciones biotecnológicas para la biorremediación de hidrocarburos, como lo son las pruebas de tolerancia *in vitro* de las bacterias aisladas a partir de los suelos contaminados con HTP (aceites de motor, petróleo, gasolina, entre otros), para así biorremediar un ecosistema edáfico contaminado con la aplicación de bacterias con capacidad de degradar a este tipo de contaminantes, ya que se estima que de todos los microorganismos presentes en el suelo, las bacterias son aquellas que se presentan en un mayor número y también las más importantes en la degradación de hidrocarburos (Sarubbi, 2000).

Por tal razón esta investigación tuvo los siguientes objetivos:

- Cuantificar la carga de bacterias heterótrofas en suelos contaminados con hidrocarburos procedentes de los talleres de mecánica automotriz de la ciudad de Puno.
- Determinar la presencia de bacterias *Pseudomonas* sp, *Alcaligenes* sp y *Bacillus* sp en suelos contaminados con hidrocarburos.
- Evaluar la tolerancia *in vitro* de las bacterias aisladas en concentraciones crecientes de petróleo (0.1, 0.5 y 1%).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 ANTECEDENTES

Soto *et al.* (2016), reportan el comportamiento de la flora microbiana aislada de un suelo contaminado con hidrocarburo, en la Costa oriental del Lago de Maracaibo (Venezuela), donde aislaron bacterias del género *Bacillus* que alcanzaron recuentos bacterianos de  $1.8 \times 10^5$  UFC/g y  $2.7 \times 10^5$  UFC/g en la muestra control y de  $10.4 \times 10^5$  UFC/g y  $10.18 \times 10^5$  UFC/g en la muestra experimental, logrando remover el contaminante al primer mes de ensayo en un 27% y al sexto mes en un 66%; por otro lado, Ojeda *et al.* (2012), en tres dosis inoculantes de *Proteus* sp sobre un suelo arcilla – limoso contaminado con hidrocarburos en tres concentraciones de hidrocarburos totales de petróleo (T1=50000 ppm, T2=70000 ppm, T3=90000 ppm) y tres repeticiones, se presentó la mayor degradación en un lapso de 90 días fue la D1 en todos los tratamientos: 70.99% (T1), 75.58% (T2) y 67.56% (T3) con poblaciones bacterianas finales de  $3.506 \times 10^3$ ,  $4.100 \times 10^3$  y  $3.867 \times 10^3$  UFC/g de suelo, respectivamente.

Llenque (2011), aisló cultivos bacterianos de suelos de oleocentros de la ciudad de Trujillo (Perú), de aproximadamente 20 cm de profundidad, cultivados en tubos con caldo de soya triptica, sales biliares y petróleo al 1%, seleccionándose cultivos que presentaron turbidez del medio a 37 °C por 48 horas, al evaluar su comportamiento bioquímico, indican una identificación preliminar que son bacilos pequeños, aerobios, Gram negativos, catalasa y citrato positivo y crecimiento en caldo nutritivo a 42 °C, correspondiente al género *Pseudomonas* sp; asimismo, Echeverry *et al.* (2010), en 4 hábitats en el ecosistema marino aledaño a una industria petroquímica en la Bahía de Cartagena (Colombia), con diferentes morfotipos que al caracterizar bioquímicamente fueron identificados como *Pseudomonas aeruginosa*, corroborando su gran capacidad de adaptación en ambientes contaminados de este tipo, mediante la biodegradación.

Chirinos *et al.* (2010), con el fin de evaluar el proceso de degradación de lodos petroquímicos ricos en hidrocarburos, realizaron el estudio en un oxisol del municipio Lagunillas del estado Zulia (Venezuela), la población bacteriana total estuvo conformada por *Pseudomonas* y *Alcaligenes*, donde sus mayores recuentos de bacterias totales se alcanzaron en la dosis de 0 L/m<sup>2</sup> de suelo y estuvo por encima de las  $2 \times 10^5$  UFC/g de suelo, seguida de las dosis de 5, 7.5 y 10 L/m<sup>2</sup>. Los resultados mostraron que las bacterias del género *Alcaligenes* se desempeñaron mejor y se adaptaron de manera aceptable ante

las condiciones de alta concentración de hidrocarburos al contrario de las *Pseudomonas*; a su vez, Maldonado *et al.* (2010), en un consorcio microbiano constituido por bacterias (*Pseudomonas* sp y *Serratia marcescens*) y hongos (*Aspergillus* sp y *Trichoderma* sp) y de un fertilizante inorgánico incorporados al suelo en la biorremediación, al inicio cuantificaron poblaciones de bacterias y hongos, donde la interacción de rizósfera, consorcio microbiano y el fertilizante originaron efectos positivos significativos (Tukey  $p \leq 0.05$ ), promoviendo la degradación del petróleo nuevo (PN) y el petróleo intemperizado (PI), logrando a los 158 días en un 47% en el suelo con 50000 mg/kg de PN y la menor en suelos con 78000 y 79457 mg/kg de PN y PI, respectivamente.

Narváez *et al.* (2008), a partir de sedimentos del Caribe colombiano realizaron aislamientos bacterianos en medio mínimo de sales suplementado con hidrocarburos (ACPM o petróleo crudo), en diferentes concentraciones (1 – 8% v/v), como única fuente de carbono, en un periodo de 21 días y nueve de las 11 cepas se identificaron como bacterias correspondientes a los géneros *Klebsiella*, *Chromobacterium*, *Flavimonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, pero tienen potencial enzimático para degradar hidrocarburos y es necesario caracterizarlas a nivel molecular con el fin de formular un consorcio que sea efectivo para la aplicación en campo; a su vez, Miranda *et al.* (2007), en bacterias degradadoras de fenantreno y fijadoras de nitrógeno RM1S, RM10S (aisladas de suelo contaminado con petróleo), RM12A (aislada de suelo contaminado con fenantreno), *Azospirillum brasilense* cd. y *A. halopraeferens* (aisladas de suelos no contaminados), lográndose una degradación de fenantreno a 30 días de inoculación, incrementándose ante la presencia de la planta (39.8%).

Cabranes *et al.* (2006), experimentaron la aplicación del bioproducto BIOIL-FC, formado por bacterias degradadoras de hidrocarburos como *Bacillus alcalophilus* cepa CBM-225 y *Bacillus licheniformis* cepa CBM-60, ésta última presentó mayor velocidad específica de crecimiento máxima ( $0.302 \pm 0.096/h$ ) y afinidad ( $4.040 \pm 0.096g/L$ ) por el n-hexadecano, no reflejando inhibición de su crecimiento hasta los 60 g/L de concentración del hidrocarburo, la cepa CBM-225 se inhibió a partir de los 23 g/L de concentración de éste; asimismo, Rivera *et al.* (2004), en la limpieza de suelos contaminados con petróleo usando el pasto alemán (*Echinochloa polystachya*) asociado con poblaciones autóctonas de bacterias y hongos rizosféricos, determinándose que las poblaciones máximas fueron de  $16 \times 10^7$  UFC de bacterias/g de suelo seco y  $17 \times 10^4$  UFC de hongos, la mayor degradación de petróleo fue a los 120 días en suelos con 100000 mg/kg con rizosfera inoculada con bacterias – hongos, tratando el 48% de los HTP.



## 2.2 MARCO TEÓRICO

### 2.2.1 Hidrocarburos

Son compuestos orgánicos que contienen átomos de carbono e hidrógeno. Se forman debido a la descomposición y transformación de seres vivos, vegetales y animales, que vivieron hace miles de años, los hidrocarburos, como el petróleo o gas, están atrapados en depósitos de rocas de las cuencas sedimentarias (material sólido), ubicados muy cerca de la superficie o varios kilómetros bajo tierra o el mar, desde donde son extraídos en estado líquido (petróleo) o gaseoso (gas natural) (Ministerio de Energía y Minas, 2012), los hidrocarburos son una fuente importante de generación de energía para las industrias, para todas las actividades en los hogares y en la vida diaria. Pero no son sólo combustibles, sino que a través de procesos más avanzados se separan sus elementos y se logra su aprovechamiento a través de la industria petroquímica (Echeverry *et al.*, 2010).

Los hidrocarburos son fuente de energía para el mundo moderno y también un recurso para la fabricación de múltiples materiales con los cuales hacemos nuestra vida más fácil, la industria de la petroquímica ha multiplicado el uso del petróleo en la fabricación de diferentes objetos fabricados con plásticos y fibras sintéticas (Chirinos *et al.*, 2010), muchas cosas que nos rodean como lapiceros, la tela de la ropa de baño, las cremas, las pinturas, los insecticidas, muchas partes de las máquinas y de los electrodomésticos, y las botellas de gaseosa necesitan de la petroquímica para subsistir, para ello las empresas de hidrocarburos deberían de realizar gestión social y ambiental responsable (De la Cruz Rodríguez, 2007).

### 2.2.2 Contaminación ambiental por hidrocarburos

Los derrames de petróleo son una de las principales fuentes de contaminación de suelos y aguas, en razón de que ocasionan perturbaciones en los ecosistemas afectando su estructura y bioprocesos, originando efectos directos sobre la biota, ya que el petróleo contiene compuestos químicos tóxicos que producen daños a las plantas, los animales y los humanos pero principalmente sobre las poblaciones de microorganismos, quienes representan parte importante del ecosistema y son esenciales para los procesos biogeoquímicos (Vasudevan & Rajaram, 2001), la estructura funcional de las comunidades de microorganismos es utilizada como indicador biológico, debido a su sensibilidad a los cambios y a su capacidad de proveer información que integre diversos factores ambientales (Alkorta *et al.*, 2003), de esta manera, la identificación de grupos funcionales

en un determinado ecosistema permite hacer una evaluación precisa de sus propiedades, tales como capacidad de recuperación y regeneración, resistencia a cambios ambientales y potencial degradativo (Benavides *et al.*, 2006).

#### **a. Efectos de los hidrocarburos en los suelos**

En presencia de hidrocarburos evidenció que el pH del suelo disminuyera en presencia del crudo, debido a la disminución en la concentración de cationes intercambiables (Osuji *et al.*, 2005; Caravaca & Roldán, 2003), por otro lado, Osuji & Opiah (2007) atribuyen el efecto a limitación de calcio y magnesio; Britton (1984) señala que es producto de la liberación de ácidos grasos y compuestos de cadena larga durante la biodegradación.

La conductividad eléctrica (CE) aumenta significativamente con el tiempo en el microcosmos, el cual se atribuye, a la actividad biológica durante la descomposición de la materia orgánica y los procesos redox, en un suelo contaminado se observa, al inicio del experimento, un incremento de la CE, lo cual se deba a que el hidrocarburo del petróleo contiene restos de compuestos salinos utilizados durante la extracción y purificación, pero luego disminuyó luego de los 120 días, Martínez & López (2001), también señalan que la variación de los valores de CE es debida de un incremento en la actividad microbiana, y el uso de aceptores de electrones alternativos (como el nitrato o el azufre) lo cual aumenta el ambiente reductor en el suelo (Osuji & Opiah, 2007).

Se presenta también la reducción significativa de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) en un suelo contaminado, el cual estaría relacionado con la adsorción de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP), en las partículas minerales del suelo, Okolo *et al.* (2005) afirman que la CIC disminuye debido a que los HCP interfieren en los sitios de intercambio de cationes (Karimi *et al.*, 1996) y en las interacciones electrostáticas (Pignatello & Xing, 1996), el porcentaje de saturación con aluminio incrementa en presencia del hidrocarburo, por tanto es asociado con la disminución de la capacidad de intercambio catiónico y pH (Adams, 1995), se observa también que a los 120 días el porcentaje de aceites y grasas disminuyen significativamente, sugiriendo que los microorganismos utilizan los HCP como fuente de carbono y energía, durante la incubación se da lugar a un proceso de biodegradación del contaminante, lo cual permitió la disminución de su concentración en casi 2%.

#### **b. Efectos de los hidrocarburos en las bacterias de los suelos**

Se aprecia el aumento significativo en la densidad de bacterias en el suelo contaminado,

lo cual se atribuye a la incorporación de microorganismos provenientes de hidrocarburos del petróleo (HCP) y su proliferación, debido a las nuevas condiciones del ambiente, al inicio predominan las bacterias bacilares Gram negativos, mientras que al final del experimento predominaron los Gram positivos, en un suelo sin contaminación por HCP, luego de 120 días, se expresaron cocos Gram positivos, ausentes al inicio del experimento, y que disminuyen la proporción de bastones Gram negativos (Atlas & Bartha, 2002), por otro lado, Kaufmann *et al.* (2004), después de la contaminación con HCP se logra el incremento de la comunidad microbiana y un decrecimiento en la diversidad, quizá por selectividad de algunos organismos capaces de adaptarse y utilizar los nuevos sustratos, ya que los componentes tóxicos de los hidrocarburos podrían inhibir la expresión de algunos miembros de la comunidad bacteriana (Yerushalmi *et al.*, 2003).

### 2.2.3 Biodegradación del petróleo

Las poblaciones nativas de bacterias tienen la habilidad para degradar hidrocarburos y se constituye en uno de los mecanismos principales que poseen determinados ambientes para mitigar el impacto originado por la presencia del petróleo crudo y sus derivados y es el principal mecanismo natural por el cual son removidos de dichos ambientes (Head *et al.*, 2006), el petróleo ingresa al ambiente de manera natural a través de afloramientos naturales o derrames y accidentes ocasionados por el hombre, siendo la causa más importantes (Atlas, 1981), actualmente aún se pueden encontrar en las costas restos del petróleo derramado (Schrope, 2010), otra fuente de contaminación son las emanaciones naturales ubicadas en las zonas petroleras (Scholz *et al.*, 2008), sus consecuencias ecológicas, sociales y económicas, han sido severas ya que los hidrocarburos contenidos en el petróleo causan mortandad en peces y en otros organismos, afectando principalmente las actividades de la industria pesquera, así como las cadenas tróficas de las zonas costeras y terrestres conllevando a graves problemas ecológicos.

El consumo de petróleo por microorganismos lo realizan como única fuente de carbono y energía, dicha capacidad metabólica de consumir los hidrocarburos se aprovecha para la biorremediación de ambientes terrestres y acuáticos, donde la biorremediación consiste en el uso de diferentes métodos para favorecer la tasa de consumo del petróleo y con eso se mitiga el efecto nocivo en el ambiente, entre los métodos más utilizados se tienen la aplicación de enzimas, nutrientes y el uso de microorganismos previamente adaptados al consumo de petróleo entre otros (Das & Chandran, 2011), a comparación con los métodos químicos de uso frecuente (como los dispersantes), los procesos de biorremediación ofrecen muchas ventajas como el bajo costo, el manejo seguro, además de que no generan

impacto ambiental.

Sin embargo, debido a que estos compuestos están prescritos con detergentes como es el propanol pueden incrementar la toxicidad del petróleo en los organismos marinos, además teniendo un efecto tóxico en las comunidades microbianas (Mascarelli, 2010), en tal sentido, su uso todavía se encuentra en discusión por la comunidad científica internacional, ya que carecen de más estudios sobre toxicidad a diferentes niveles (microorganismos y organismos superiores), para evaluar si originarían efectos secundarios tomando en cuenta los probables escenarios que se generan por su uso y la presencia del petróleo, es conocidos que durante el proceso de degradación del petróleo, participan varias especies de bacterias y sus diferentes procesos metabólicos pueden alcanzarse tasas de consumo hasta del 100% (Das & Chandran, 2011).

La gran variabilidad de especies y géneros microbianos, se debe a que diferentes bacterias que tienen afinidad por ciertos hidrocarburos, como se ha observado en *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Mycobacterium* sp., las cuales degradan alcanos monoaromáticos y poliaromáticos respectivamente (Salleh *et al.*, 2003), sin embargo, también se ha visto que pueden participar en simbiosis; en condiciones anaerobias durante la degradación de alcanos, se ha observado también la participación de bacterias sulfatorreductoras y metanogénicas (Morris *et al.*, 2013).

Entre otros factores importantes, las poblaciones microbianas durante la degradación del petróleo son afectados por los factores abióticos de la zona (pH, temperatura, salinidad, oxido-redox, entre otros), así como las propiedades fisicoquímicas del petróleo (ligero o pesado), la combinación de ambos factores puede favorecer o afectar la diversidad bacteriana (Das & Chandra, 2011), Hazen *et al.* (2010), consignaron un cambio de las comunidades microbianas, entre las zonas contaminadas y las de sus alrededores en estudios de ecología microbiana a 1500 m de profundidad, realizados a lo largo de la pluma de contaminación durante el derrame de petróleo en el Golfo de México, dichas variaciones fueron asociadas principalmente a las diferencias en la concentración de oxígeno y al petróleo, en razón de que observaron un gradiente de concentración y la transformación del petróleo a lo largo de la pluma de contaminación, tal como se presentó las poblaciones microbianas por estratificación en los sedimentos, debido al petróleo y la baja concentración de oxígeno (Schubotz *et al.*, 2011).

Existen muchos reportes de bacterias participantes en la degradación del petróleo (Bartha & Atlas, 1977), en el Golfo de México se ha encontrado una gran diversidad microbiana, en estudios llevados en zonas de las costas de Florida, Campeche, Veracruz (México) y en el delta del río Mississippi (EE. UU.), que han sido afectadas por derrames de petróleo, en dichos lugares, se detectaron alrededor de 24 especies de bacterias distribuidas en 14 géneros, entre los que se encontraron se citan a *Gammaprotobacteria*, *Marinobacter*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Kostka *et al.*, 2011), asimismo algunos géneros de bacterias hidrocarbonoclastas como *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thalassolituus*, *Cycloclasticus* y *Oleispira* (Mortazavi *et al.*, 2013).

Las bacterias hidrocarbonoclastas son un grupo de bacterias tienen la particularidad de alimentarse exclusivamente de petróleo, utilizándolo como única fuente de carbono y energía, juegan un papel muy importante en la biodegradación del petróleo ya que conforman hasta un 90% de las especies encontradas en las zonas contaminadas (Yakimov *et al.*, 2007), por eso que este tipo de bacterias son utilizadas para evaluar zonas perturbadas por petróleo, al calcular la tasa bacteriana hidrocarbonoclastas/heterótrofas (Hi/He) como un índice de impacto (Lizárraga *et al.*, 1983), de igual manera se han encontrado lugares afectados por hidrocarburos en el oeste del caribe mexicano, donde debido al arrastre de estos compuestos por las corrientes marinas se concentran en ciertas áreas favoreciendo el crecimiento de estas bacterias (Lizárraga *et al.*, 1990).

#### **2.2.4 Bacterias heterótrofas**

Los microorganismos heterótrofos obtienen su energía por medio de los procesos de oxidación de la materia orgánica presente en el suelo (Coyne, 2000), dichos microorganismos cumplen un papel muy importante en los ciclos biogeoquímicos como el ciclo de carbono, reciclando o mineralizando el material orgánico en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Atlas & Bartha, 2001), gracias a la distribución ubicua, mucha abundancia y principalmente capacidades metabólicas diversas, los microorganismos heterótrofos son los principales responsables de las actividades de descomposición de la materia orgánica (Lederberg, 2000), los microorganismos heterótrofos poseen gran diversidad de exigencias en sustratos carbonados, que varían desde los hidratos de carbono, los alcoholes y los ácidos orgánicos sencillos hasta los compuestos polimerizados, entre ellos la celulosa y la lignina, la gran mayoría son saprofitos comunes del suelo, eficaces transformadores de sustratos edáficos en biomasa (Julca *et al.*, 2006).

Existe la necesidad de estudiar relaciones entre microorganismos y su ecosistema, en tal sentido es necesario determinar la biomasa y la actividad microbiana en su hábitat natural (Atlas & Bartha, 2001), el conteo microbiano utiliza procedimientos para su detección, entre los más empleados se tiene los sistemas de enumeración directa, la siembra en placa, la microscopia por epifluorecencia y la determinación del número más probable (Yu *et al.*, 1995), la ventaja de la siembra en placa, radica en que se obtiene una alta variedad de morfotipos que pueden posteriormente ser estudiados, asimismo, se puede obtener la recuperación de microorganismos de lento crecimiento o que poseen condiciones exigentes para su desarrollo y multiplicación (Balestra & Misaghi, 1997), para entender mejor a los microorganismos cultivables se deben desarrollar métodos de cultivo simples y así lograr obtener colonias de bacterias del suelo en laboratorio, en tiempos actuales el uso de técnicas moleculares, son satisfactorios, por ahora son bastaste costosas y dispendiosas, por lo que todavía se viene utilizando medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos (Joseph *et al.*, 2003).

Todo microorganismo requiere una serie de nutrientes para su crecimiento y formación de nueva biomasa, entre ellos los requeridos en grandes cantidades (macronutrientes), como el carbono, el nitrógeno y el fósforo y aquellos que se requieren en pequeñas cantidades como el potasio, el cobre, el níquel, el molibdeno, llamados también como micronutrientes (Atlas & Bartha, 2001), todo cultivo microbiano debe tener una fuente de nitrógeno (N), como el amonio, el nitrato o aminoácidos, el N es utilizado por las bacterias para que sintetizen aminoácidos y bases nitrogenadas, entre otras moléculas de importancia para la fisiología microbiana (Sylvia *et al.*, 2005).

Por otro lado, también son requeridos el azufre, el potasio, el fósforo y el magnesio, necesarios para que los microorganismos sintetizen moléculas, como los ácidos nucleídos, las vitaminas, las coenzimas, entre otras moléculas, así como cumplen funciones como cofactores enzimáticos como el Mg (Madigan *et al.*, 2001), otros elementos como el cobre, el níquel, el cromo, el manganeso, el molibdeno, el selenio y el zinc, conocidos como micronutrientes o elementos traza, son requeridos a bajas concentraciones ya que desempeñan función estructural en las enzimas, como el  $\text{Mo}^{6+}$  necesario en la nitrogenasa que es el enzima que cataliza la conversión del nitrógeno atmosférico en amoníaco en la fijación biológica de nitrógeno (Atlas, 1995).

El carbono (C) integra la composición química de los seres vivos y es parte de la atmósfera, hidrosfera y litosfera, en la atmósfera se encuentra en forma de anhídrido carbónico ( $\text{CO}_2$ ),

que constituye el 0.03% de la misma, en la hidrosfera, el carbono forma parte del ion bicarbonato ( $\text{HC-O}_3$ ) y de ion carbonato ( $\text{C}_{2-3}\text{O}$ ), en la litosfera tiene tres maneras diferentes, formando rocas carbonatadas, silicatos cálcicos o en forma de combustibles fósiles (Navarro, 2000), el C se transfiere por el  $\text{CO}_2$  de la atmosfera mediante el proceso de la fotosíntesis y vuelve a ella a través de la respiración de los animales (Madigan *et al.*, 2001).

El C es útil para la formación de moléculas y como fuente de energía, en el caso de muchos heterótrofos, varía en la concentración y el tipo de compuestos orgánicos que necesitan como fuente de carbono de acuerdo a su metabolismo (Merck, 2004), los compuestos entre ellos los aminoácidos, los ácidos grasos y los compuestos aromáticos pueden ser usados por los microorganismos como fuentes de carbono (Coyne, 2000), los factores de crecimiento incluyen vitaminas, aminoácidos y bases nitrogenadas, aunque la mayoría de los microorganismos son capaces de sintetizar estos compuestos, otros requieren tomarlos del medio ambiente (Sylvia *et al.*, 2005).

### 2.2.5 Bacterias degradadoras de hidrocarburos

Se caracterizan por que son bacterias con capacidad de utilizar hidrocarburos (*Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Psychrobacter* y *Shewanella*) mostrando que estos microorganismos se desarrollan a partir de estos y son de similares características. Dentro de estos cinco géneros mencionados, las especies más representativas son *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Megaterium* y *Pumilus*, *Psychrobacter immobilis* y *Shewanella putrefaciens* (Pucci *et al.*, 2010).

### Taxonomía de bacterias degradadoras de hidrocarburos

**Reino:** Bacteria

**Filo:** Proteobacteria

**Clase:** Gamma Proteobacteria

**Orden:** Alteromonadales

**Familia:** Pseudomonadaceae

**Género:** Pseudomonas

**Especie:** *Pseudomonas* sp.

**Reino:** Bacteria

**Filo:** Firmicutes

**Clase:** Bacilos

Orden: Bacillales

**Familia:** Bacillaceae

**Género:** *Bacillus*

**Especie:** *Bacillus* sp.

**Reino:** Bacteria

**Filo:** Proteobacteria

**Clase:** Beta Proteobacteria

Orden: Burkholderiales

**Familia:** Alcaligenaceae

**Género:** *Alcaligenes*

**Especie:** *Alcaligenes* sp.

En bosques y forestales, no poseen diferencias significativas en los recuentos de microorganismos heterótrofos, pero si se presentaron recuentos mayores en medios bajos en contenido de nutrientes, la variabilidad microbiana puede deberse al contenido, la clase y la composición la materia orgánica del suelo dependerá de los factores ambientales, tales como el clima, la posición geográfica, la temperatura, el uso del suelos, entre otros, y los factores edáficos como la humedad, la temperatura, el pH y la aireación (Mantilla *et al.*, 2000), estas variaciones edáficas provee diversas condiciones para el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos (Latorre, 2007).

### 2.2.6 Biorremediación

La biorremediación es el diseño de procesos en que intervienen organismos o productos derivados de éstos para eliminar sustancias tóxicas o contaminantes en aguas residuales urbanas, vertidos industriales y entornos naturales contaminados, se sabe que la mayoría de los compuestos naturales se degradan con facilidad, con excepciones como la lignina, presente en la madera (Kumar *et al.*, 2005), no contemplando la introducción de compuestos aromáticos en la biosfera, la limitante en la biodegradación o detoxificación de dichos compuestos es la deficiencia de rutas metabólicas microbianas, aunque existan enzimas para llevar a cabo la completa mineralización de los xenobióticos, los cuales no son lo suficientemente rápidos para mantener un equilibrio entre la liberación y eliminación de éstos (Smith, 1994).

La remoción de los hidrocarburos involucra procesos fisicoquímicos, los cuales se lleva a cabo bajo condiciones aerobias, anaerobias o ambas, ganando terreno en esta área, los



más comunes son la extracción con solventes u oxidación química, la adsorción por carbono activado e incineración, pero este tipo de estrategias resultan ser muy costosas y difíciles de llevar a cabo (Shan, 2002), por el contrario, el uso de microorganismos es una opción viable por su variable bioquímica y molecular y ser una tecnología sencilla, de bajo costo y compatible con el medio ambiente (Kleerebezem *et al.*, 1999), donde el uso de los microorganismos permite el consumo de menos energía, ofreciendo posibilidades de reciclaje y ser más específicos.

El catabolismo microbiano de los compuestos aromáticos motivó el uso potencial del petróleo (sustrato) para la producción de proteína celular en la industria alimenticia y luego como una solución para la remediación del medio ambiente contaminado por hidrocarburos (Chakraborty & Coates, 2004), los microorganismos son recicladores naturales que convierten los compuestos xenobióticos a productos inofensivos como el dióxido de carbono y el agua (Kumar *et al.*, 2005), una aplicación práctica los reportan Gibson & Subramanian (1984) quienes en condiciones favorables lograron la biodegradación de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX), complementando Inouye *et al.* (1981) reportaron que *Pseudomonas putida* cepa mt-2 fue capaz de biodegradar completamente el tolueno y meta y para xileno, por otro lado, Tsao *et al.* (1998) reportaron que el xileno no fue removido debido a la formación de residuos inhibitorios para las bacterias.

Las bacterias en la naturaleza, pueden metabolizar un rango limitado de hidrocarburos como sustratos, requiriéndose de la cooperación entre diferentes organismos (consorcios) y dicha sinergia entre sistemas enzimáticos, removería del suelo y agua mezclas complejas de hidrocarburos como el petróleo crudo (Leahy & Colwell, 1990), gran cantidad de bacterias aerobias/anaerobias y hongos biodegradadores de hidrocarburos fueron aislados desde sistemas marinos y terrestres, es el caso del género *Rhodococcus* que posee la habilidad para crecer y utilizar una amplia variedad de compuestos xenobióticos incluyendo hidrocarburos tanto alifáticos como aromáticos (Kim *et al.*, 2004), bacterias del género *Pseudomonas*, fueron capaces de remover los compuestos aromáticos (Díaz *et al.*, 2001), en sus especies *P. putida* F1 es capaz de utilizar ya sea al benceno, al tolueno o al etilbenceno como única fuente de carbono y energía, asimismo Cooper & Skinner (1980) indicaron que *Escherichia coli* tiene la capacidad de metabolizar ácidos aromáticos.

Lee & Lee (2001), aislaron y caracterizaron *Ralstonia* sp PHS1, y fue capaz de remover los BTEX, por otro lado, Acuña *et al.* (2003), reportaron que de una biomasa aclimatada a gasolina aislaron bacterias como *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp y

*Rhodococcus* sp, completando Knight *et al.* (1999), que un sedimento puede ser usado como un consorcio (bacterias y hongos) y enriquecido por poblaciones individuales puedan degradar un amplio rango de compuestos; sin embargo, la degradación ocurre después de largos períodos de adaptación, durante los cuales se estimula la actividad bacteriana.

### 2.2.7 Mecanismos genéticos y fisicoquímicos

El petróleo crudo (PC) induce a la selección de microorganismos con capacidades metabólicas para degradar a sus derivados, este proceso involucra genes, complejos enzimáticos y vías metabólicas relacionadas, donde la capacidad de un microorganismo para asimilar diferentes mezclas de hidrocarburos dependerá de la especificidad de sus enzimas, entre ellas las monooxigenasas, dioxigenasas y lipooxigenasas que tienen el potencial para convertir el petróleo y sus derivados en enantiómeros que puedan ser asimilados, ampliándose de esta forma el ámbito de sustratos disponibles para el metabolismo (Van Hamme *et al.*, 2003).

La evolución genética característica en bacterias ha originado la aparición y diseminación de rutas metabólicas para degradar gran variedad de hidrocarburos aromáticos (Leisinger & Brunner, 1986), por otro lado, la masiva liberación de agentes xenobióticos, desde el punto de vista evolutivo, no ha permitido a los microorganismos desarrollar propiedades catabólicas suficientes para reducir el problema medioambiental originado por la acumulación de estos compuestos en distintos ecosistemas; pero es posible conseguir una completa mineralización de ciertos agentes xenobióticos sustituyendo la fuente de carbono metabolizable por el compuesto en estudio, mediante un proceso de adaptación microbiana que provoca la capacidad biodegradativa (Weiner & Lovley, 1998), dichos mecanismos se constituyen la inducción de enzimas específicas para la degradación del sustrato y por otra, la alteración de la actividad enzimática originada por procesos de adaptación genética como la recombinación, transposición o mutación.

#### a. Mecanismos genéticos

Un consorcio o un microorganismo cuando se expone a un nuevo sustrato, tiende a desarrollar la capacidad de iniciar una serie de cambios entre ellos enzimáticos, para luego adaptarse y metabolizar el nuevo sustrato (Chackraborty & Coates, 2004), también se ha demostrado rearrreglos en el ADN, precedido a la evolución de diferentes vías catabólicas (Van Der Meer *et al.*, 1992), dichos mecanismos o combinaciones genéticas se mencionan:

- 1) El primer paso es incrementar la biomasa de la población de los organismos que toleran o degradan al hidrocarburo por inducción de genes apropiados (Van Der

Meer *et al.*, 1992).

- 2) Los microorganismos también se adaptan por mutaciones de varios tipos (sobre todo del tipo de un simple nucleótido), las mutaciones en un nucleótido pueden alterar la unión del sustrato-enzima (Leahy & Colwell, 1990), asimismo, Ramos *et al.* (1987) reportaron que la alteración de un residuo aminoacídico en la enzima catecol 2,3 dioxigenasa reconoció al 4-etilcatecol como su sustrato.
- 3) Los microorganismos obtienen la información genética por transferencia horizontal de genes, los elementos móviles juegan un papel importante en el rearrreglo del ADN, la transferencia de genes y en la activación – inactivación de genes silenciadores (Hendrickx *et al.*, 2006), ante ello Van Der Meer *et al.* (1992) reportan que el gen que codifica para la clorobenceno dioxigenasa está flanqueado por dos copias de elementos móviles IS1066 y IS1067, asimismo en la adaptación existen otros factores tales como la temperatura, el oxígeno, los nutrientes, el pH, entre otros, que pueden afectar la biodegradación de los hidrocarburos.

#### **b. Mecanismos fisicoquímicos**

**Temperatura.** La temperatura que varía entre 30 °C y 40 °C, admite a los microorganismos biodegradadores incrementar su metabolismo sobre los hidrocarburos aromáticos (Van Der Meer *et al.*, 1992), asimismo, Lee & Lee (2001) en el aislamiento de *Ralstonia* sp. PHS1 que es termotolerante, es capaz de biodegradar al complejo BTEX.

**Oxígeno.** El catabolismo de los hidrocarburos donde participan microorganismos viene relacionado con la oxidación del sustrato por las oxigenasas, por lo se requiere de oxígeno (Leahy & Colwell, 1990), sin embargo, disminuyen la biodegradación del complejo BTEX debido al bajo grado de transferencia, la baja solubilidad y el rápido consumo del oxígeno, (Van Der Meer *et al.*, 1992).

**Nutrientes.** La liberación al medio ambiente de excesivas concentraciones de carbono / nitrógeno o carbono / fósforo y bajas concentraciones de nutrientes inorgánicos, provoca condiciones perjudiciales para los microorganismos (Leahy & colwell 1990).

**pH.** El pH en el suelo es muy variable (2.5 - 11.0), lo que es una desventaja para los microorganismos ya que su crecimiento se ve favorecida a un pH neutro, lo cual fue demostrado por Leahy & colwell (1990) quienes observaron que a un pH entre 6.5 y 7.5 favorece la mineralización de petróleo crudo.

### c. Bases moleculares de las bacterias biodegradadoras

Las bacterias del suelo poseen una amplia variedad de enzimas para la oxidación inicial de los compuestos aromáticos, la formación de los productos intermedios (catecol y protocatehuate) y la ruptura del anillo aromático (Kasak *et al.*, 1993); sin embargo, son muy pocos los reportes sobre la diversidad génica de los microorganismos biodegradadores, debido a las enzimas no han sido purificadas y también estudiadas superficialmente (Song & Ward, 2005).

### d. Proteínas expresadas durante la degradación de los BTEX

Las enzimas dioxigenasas, son las principales enzimas que se expresan durante la biodegradación de los hidrocarburos aromático, son también conocidas como ferropoteínas del grupo no hemo, estas enzimas llevan a cabo la hidroxilación de los hidrocarburos aromáticos en presencia de oxígeno y NADH (Bagnèris *et al.*, 2005), tienen un sistema de tres componentes conocidos como: a) flavoproteína reductasa b) ferredoxina (transfiere electrones desde el NADH) y c) sitio catalítico (ISP) con un grupo de fierro – azufre, el cual está formado por dos proteínas referenciadas como subunidad  $\alpha$  y subunidad  $\beta$ , donde la primera participa en la transferencia de electrones, contiene el centro catalítico de estas enzimas y contiene el sitio de unión al sustrato, mientras que la subunidad  $\beta$  sirve para reconocer la región promotora de los operones catalíticos (Witzig *et al.*, 2006).

Otra proteína que participa en la degradación de los anillos aromáticos, es la enzima benceno deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>, Fong *et al.* (1996) indican que esta enzima es necesaria para convertir el cis-benceno dihidrodiol en catecol; así mismo, que es análoga a la cis-tolueno dihidrodiol deshidrogenasa y a la enzima glicerol deshidrogenasa de *E. coli*, asimismo, Jiang *et al.* (1996) afirman que la subunidad  $\alpha$  de las dioxigenasas mantienen aminoácidos conservados en su secuencia, en un estudio filogenético realizado por Hendrickx *et al.* (2006), consiguen que las enzimas dioxigenasas mostraron una alta similitud entre sus secuencias aminoacídicas, lo cual indica que estas proteínas posiblemente provienen de un gen ancestral común.

Las enzimas monooxigenasas, pertenecen a la familia de las oxigenasas, su estructura proteica es similar al sistema multienzimático de las dioxigenasas, llamadas también hidroxilasas y catalizan la transferencia de oxígeno al sustrato utilizando NADH o NADPH como agente reductor, Harayama *et al.* (1986) indican que la enzima xileno monooxigenasa, relacionada con la degradación del xileno, está formada por dos

componentes proteicos la *xyIM* y la *xyIA*, la primera está relacionada con la enzima alcanohidroxilasa, mientras que el componente *xyIA* es similar a las ferredoxinas reductasas, adicionando Sabirova *et al.* (2006) reportan que el metabolismo aerobio de los alcanos se lleva a cabo primero por la oxidación de estos en donde participan las enzimas monooxigenasas, todas las proteínas son expresadas a partir de genes catabólicos que forman parte de un operón (Atlas & Bartha, 2002).

#### e. Genes catabólicos en bacterias aerobias

##### e.1 Expresión de genes de las enzimas dioxigenasas

Existen diversos genes catabólicos afines con la biodegradación de hidrocarburos aromáticos, cuyo producto forma un sistema multienzimático, el cual inicia con el catabolismo aerobio (Jiang *et al.*, 1996), estos genes codifican la enzima benceno dioxigenasa designados como *bed A* (oxidoreductasa), *bed B* (ferredoxina), *bed C1* y *C2* (oxigenasa terminal [subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ ]) (Bagneris *et al.*, 2006), por otro lado, Fong *et al.* (1996), identificaron un cuarto gen que fue designado como *bedD* y codifica la enzima benceno deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$ , necesaria para convertir el cisbenceno dihidrodiol en catecol.

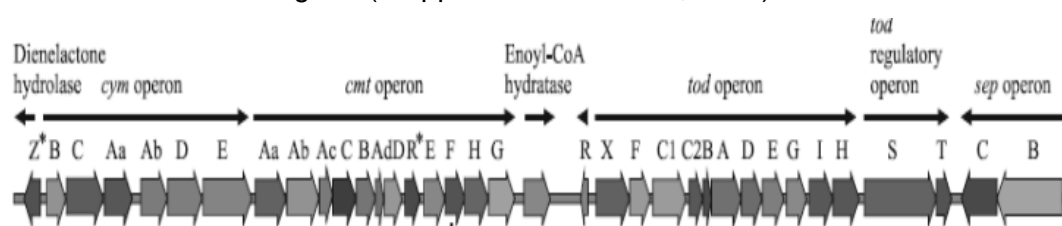
Otros genes del operón *Tod* fueron estudiados, entre ellos se citan a la *Tod A* (reductasa TOL), *Tod B* (ferredoxina TOL), *Tod C1* y *C2* (ISP (subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ ) TOL), *Tod D* (deshidrogenasa TOL) y *Tod E* (metil-catecol dioxigenasa TOL) (Jiang *et al.*, 1996), el gen responsable de la remoción del etilbenceno es la *Ebd* (subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ ) y expresa la enzima etilbenceno dioxigenasa (Bagneris *et al.*, 2006), en estos operones los genes *xyIC1* y *C2* codifican para la enzima xileno dioxigenasa (subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ ), mientras que la *XyIA* y *XyIB* expresan la enzima xileno oxidasa y la alcohol deshidrogenasa (Inouye *et al.*, 1981), además, se identificaron dos genes que son reguladores de la expresión génica (*XyIR* y *XyIS*), los operones referidos, presentan la misma composición y arreglos de sus genes, al igual que sus secuencias nucleotídicas que son muy similares (Bagnèris *et al.*, 2006).

Las tres proteínas que participan en la degradación del catecol (ruta orto), son producto de los genes *catA* (C1,2O), *catB* (enzima muconato lactonizante) y *catC* (muconolato isomerasa) (Harayama *et al.*, 1986), estos genes son inducidos por el catecol y el cis-cis muconato, los genes *catB* y *catC* están coordinadamente controlados y se encuentran en el cromosoma, mientras que el gen *catA* se encuentra separado de este operón (González *et al.*, 2004).

## e.2 Expresión de genes que codifican para las monooxigenasas

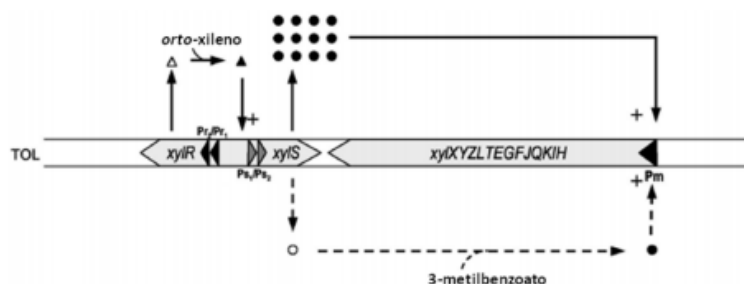
Los genes que codifican las monooxigenasas se han designado como *tmo ABCDE*, el gen *tmoC* codifica para una ferredoxina que tiene alta similitud en la secuencia nucleotídica con su contraparte, el gen *TodC*, las rutas catabólicas están controladas por proteínas reguladoras (activadoras) específicas (Hendrickx *et al.*, 2006), a la fecha se han identificado genes reguladores de rutas catabólicas y sus productos, dichos genes son:

- 1) Las proteínas *TodST* controlan la degradación del tolueno (Figura 1) desde el promotor *todX*, el cual se encuentra río – arriba del operón *todXFC1C2BADEGIH*, mientras que los genes *TodST* están localizados ríoabajo de *TodH* (Lee *et al.*, 2006), *TodS* es una proteína que consta de 978 aminoácidos, un peso de 108 kda y de cinco dominios conocidos como motivos: a) bZIP, que tiene una estrecha región de amino ácidos básicos que posiblemente se unen al ADN diana, b) Hk1 y Hk2 (dominios de histidinas) que fueron establecidos como potenciales sitios de autofosforilación y c) G1 y G2, los cuales están relacionados con la unión al ATP y un sitio de unión al oxígeno (Troppe & Van Der Mer, 2004).



**Figura 1.** Mapa genético del Operón *tod* de *Pseudomonas putida* KL47 (Lee *et al.*, 2006).

- 2) La proteína *XylS* regula su operón catabólico y actúa como activador de la transcripción en presencia de la molécula inductora que es el xileno, se encuentran río – arriba del operón diana, sin embargo, se observa que la expresión de *xyIS* depende de otra proteína reguladora conocida como *XylR*, por otro lado, la proteína *XylR* estimula la transcripción de *xyIS* desde un promotor dependiente llamado Ps1, cuando las células están expuestas al m- y p-xilenos (Aranda *et al.*, 2005), en ausencia de estos inductores, los genes *xyIS* se expresan en niveles muy bajos desde un promotor dependiente llamado Ps2, mientras que *XylR* también se transcribe desde los promotores dependientes de conocidos como PR1 y PR2 (González *et al.*, 2004). (Figura 2).



**Figura 2.** Regulación catabólica en presencia de xileno (González *et al.*, 2004).

- 3) Los reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTRs) normalmente codifican para proteínas reguladoras de la transcripción (CatM), excepto CatR que codifica para un represor, la CatR regula el operón catabólico que controla la expresión de los genes *catBCA* durante el metabolismo del catecol en *P. putida* (Aranda *et al.*, 2005), la proteína CatR está compuesta de 394 a 403 aminoácidos y tiene un peso de 32 a 37 Kda y está relacionada con el sitio de unión al ADN localizada en la región amino-terminal en el residuo 66, los residuos del 95 al 173 y del 196 al 206 son sitios de unión al inductor (González *et al.*, 2004).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 TAMAÑO DE MUESTRA

El muestreo a realizar en la investigación, fue no probabilístico por conveniencia (Casal y Mateu, 2003), y estuvo conformado por tres talleres de mecánica automotriz de la ciudad de Puno, ubicados en la Av. Simón Bolívar entre la Av. Branden y el Jr. Ricardo Palma, en cada taller se colectó tres muestras las cuales fueron mezcladas en un frasco. En cada zona se llevó a cabo tres muestreos, los cuales se ejecutaron por tres meses consecutivos, haciendo un total de 27 unidades experimentales, tal como se muestra en el siguiente cuadro:

**Tabla 1.** Distribución de muestreos en los talleres de mecánica automotriz de la ciudad de Puno, julio – 2017.

Meses de muestreo	Zonas de muestreo			Total
	Taller 1	Taller 2	Taller 3	
Mes 1	3	3	3	9
Mes 2	3	3	3	9
Mes 3	3	3	3	9
Total	9	9	9	27

#### 3.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO

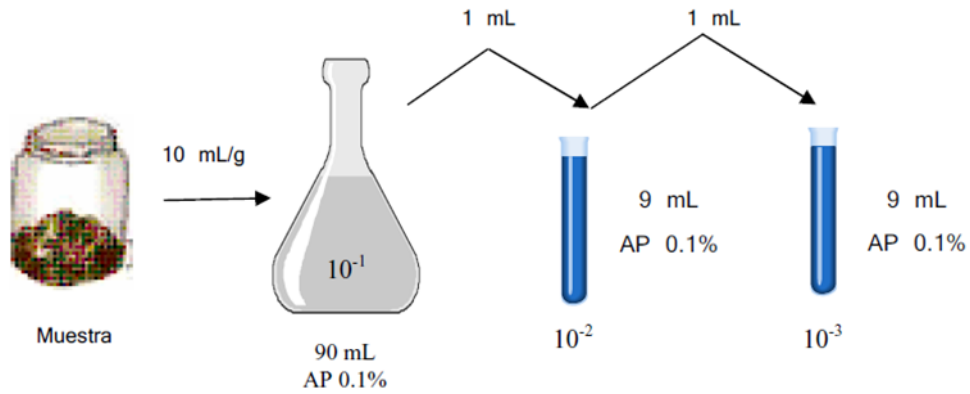
En los talleres se colectó el suelo hasta una profundidad máxima de 10 cm, seguidamente fueron colocadas en bolsas ciplot de cierre hermético nuevas, las que se encontraron debidamente rotuladas y transportadas en una caja de tecnopor con bolsas de hielo que mantuvo la temperatura a 4 °C aproximadamente, hasta que las muestras fueron procesadas en el laboratorio (Zúñiga, 2010). Posteriormente se llevaron las muestras al laboratorio de Ecología de la FCCBB de la UNA – P, donde se realizaron los análisis y experimentos correspondientes.

#### 3.3 CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA DE BACTERIAS HETERÓTROFAS EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

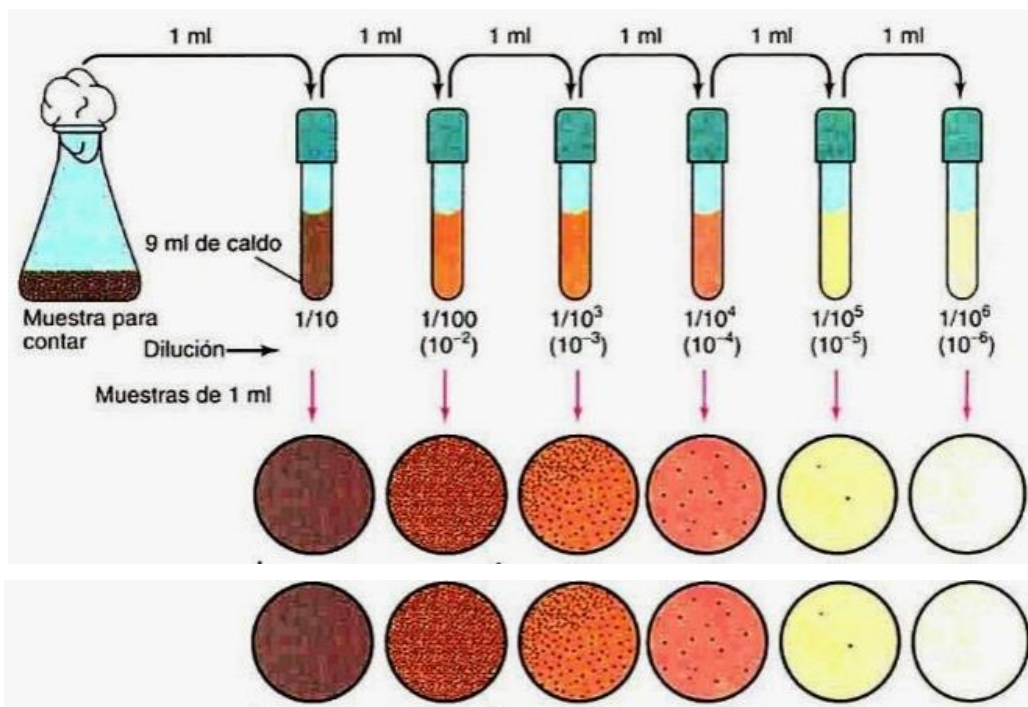
**Pre-enriquecimiento de las muestras.** Las muestras recolectadas se les colocaron en recipientes plásticos de primer uso y se adicionó petróleo al 0.5%, se homogenizó con una espátula y se incubó por 5 días a temperatura ambiente (Llenque, 2011).



**Cuantificación de bacterias.** Se tomaron 10 g de muestra, y a partir de él se realizaron diluciones decimales seriadas (Figura 3), a continuación, se dispersó 0.1 ml de solución por placa Petri en medio de cultivos selectivos para bacterias heterótrofas (medio Agar APC o agar Plate Count) (Rivera *et al.*, 2002) y se incubó a 28 °C por 120 horas.



**Figura 3.** Esquema de preparación de muestras y diluciones. (Rivera *et al.*, 2002)



**Figura 4.** Esquema de preparación de diluciones para recuento bacteriano. Madigan M., Martinko J. & Parker J. (2001).



**Figura 5.** Cultivo por extensión con asa Digralsky para recuento bacteriano, laboratorio de Ecología, julio – octubre 2018.

Los recuentos se realizaron en placas donde el número de colonias osciló entre 30 y 300 colonias (Figura 4). El promedio de los recuentos de las dos placas (repeticiones) fueron multiplicados por el factor de dilución y el resultado se obtuvo en UFC/g de suelo (Figura 5).

**Análisis estadístico.** El diseño experimental fue de bloque completo al azar. Los tratamientos estuvieron conformados por las zonas de muestreo (barrios Cerro Colorado, Laykakota y Progreso) y tres bloques que fueron los meses de muestreo (octubre, noviembre y diciembre). Los datos obtenidos de los recuentos bacterianos fueron evaluados mediante un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), si en caso existiera diferencia estadística significativa, y así elegir la zona con el más alto recuento bacteriano. Cuyo modelo matemático fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

**Donde:**  $i = 1, 2, \dots, t$ ;  $j = 1, 2, \dots, r$ ;  $\mu$  = parámetro, efecto medio;  $\tau_i$  = parámetro, efecto de tratamiento  $i$ ;  $\beta_j$  = parámetro, efecto de bloque  $j$ ;  $\varepsilon_{ij}$  = valor aleatorio, error experimental de la unidad experimental  $ij$ ;  $Y_{ij}$  = observación de la unidad experimental.

### 3.4 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE BACTERIAS *Pseudomonas*, *Alcalígenes* Y *Bacillus* sp EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

#### Aislamiento de cultivos puros

Los materiales utilizados se muestran en la Figura 6. Cada colonia bacteriana aislada fue transferida a tubos conteniendo 9 ml de solución salina fisiológica estéril. Se sembraron 0.1 ml de la dilución en agar nutritivo por el método de superficie con asa de Drigalsky, e incubaron a 37 °C por 48 horas.



**Figura 6.** Materiales utilizados para la identificación de bacterias, laboratorio de Ecología, setiembre – octubre 2018.

#### Caracterización morfológica de los cultivos aislados

Se realizó una caracterización macroscópica, por medio de la observación de la morfología de las colonias en un estereoscopio; además se realizó una tinción Gram de las colonias aisladas, en el que se determinó la morfología, estructura bacteriana y la presencia de endosporas (Figura 3). Luego se procedió a rotularlos.

**Bioquímica.** Se realizó pruebas bioquímicas de catalasa, crecimiento en agares MacConkey, Citrato Cimons, *Pseudomonas* (Figura 7), tinción de esporas con verde de malaquita, tinción Gram (Figura 8) e incubados a 37 y 42 °C (Mc Faddin, 1991; Forbes *et al.*, 2009), según los resultados fueron identificados las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Alcalígenes* y *Bacillus*. Con estos resultados se buscó las características

compatibles con cada género y así determinar los géneros presentes en la muestra de suelo.



**Figura 7.** Medios de cultivo preparados para la identificación bacteriana, laboratorio de Ecología, julio – octubre 2018 (de izquierda a derecha: SIM, manitol salado, Pseudomonas, EMB y TSA).



**Figura 8.** Láminas de tinción Gram de bacterias aisladas de tierra de talleres de mecánica, laboratorio de Microbiología – FCCBB, julio – agosto 2018.

### 3.5 EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA *in vitro* DE LAS BACTERIAS EN CONCENTRACIONES CRECIENTES DE PETRÓLEO

Luego de la identificación del género bacteriano, se sembraron los cultivos puro en agar nutritivo por la técnica en camada y se incubó a 37 °C por 24 horas. A continuación, cada género bacteriano fue transferido a tubos de caldo soya triptica, sales biliares 0.5 ml (2 g/30 ml) y 0.1, 0.5 y 1.0 ml de petróleo respectivamente; se homogenizó por agitación

manual por 5 min y se incubó a 37 °C por 48 horas. Se eligieron los cultivos que mostraron turbidez en el medio y se realizaron siembras en agar soya tripticasa más petróleo con 0.1, 0.5 y 1% y se incubó a 37 °C por 48 horas. Finalmente se prepararon tubos de ensayo con 8.9 ml de medio minino de sales ( $MgSO_4$  0.1 g;  $NH_4Cl$  0.5 g,  $Ca_2Cl$  0.8 g;  $H_2KPO_4$  0.1 g;  $NaCl$  0.3 g y 200 ml de agua destilada), y se suplementó con 0.1, 0.5 y 1 ml de petróleo y 0.5 ml de solución de sales biliares (2 g en 30 ml); finalmente se adicionó 1 ml de la suspensión bacteriana a evaluar. Se homogenizó manualmente por 5 min y se incubó a 37 °C por 5 días. Todos los procedimientos realizados se aprecian entre las figuras 9 y 14.



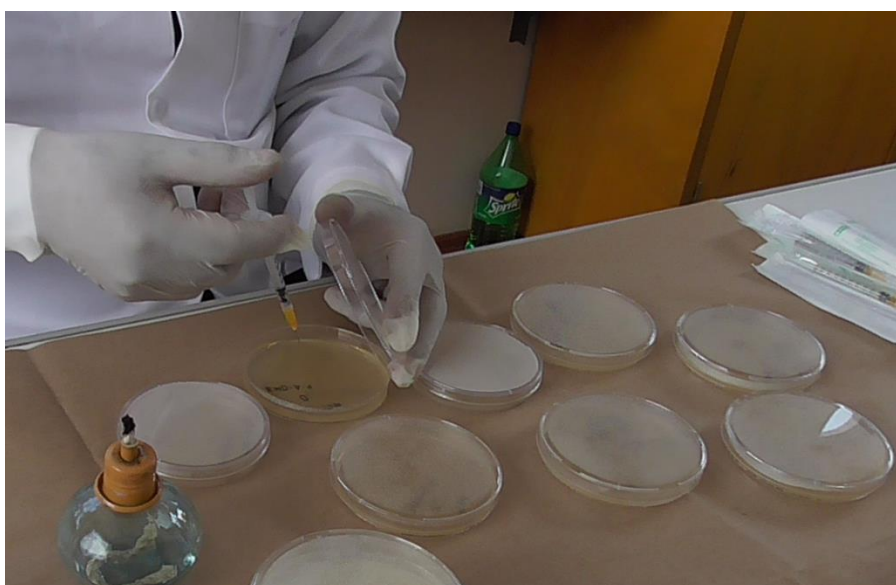
**Figura 9.** Preparación de medios de cultivo con concentraciones crecientes de petróleo, laboratorio de Ecología – FCCBB, julio – agosto 2017.



**Figura 10.** Plaqueado de medios de cultivo con concentraciones crecientes de petróleo, laboratorio de Ecología – FCCBB, julio – agosto 2017.



**Figura 11.** Preparación de solución salina de bacterias para cultivo por extensión a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml (estándar McFarland N° 0.5), laboratorio de Ecología – FCCBB, setiembre – octubre 2017.



**Figura 12.** Transferencia de 1 ml de dilución bacteriana en plagas con medio TSA con concentraciones crecientes de petróleo, laboratorio de Ecología – FCCBB, setiembre – octubre 2017.



**Figura 13.** Cultivo por extensión de las diluciones bacterianas mediante el asa de Digrafsky en agar TSA con diferentes concentraciones de petróleo, laboratorio de Ecología – FCCBB, setiembre – octubre 2017.



**Figura 14.** Placas de agar TSA con diferentes concentraciones de petróleo y bacterias cultivadas por extensión, laboratorio de Ecología – FCCBB, setiembre – octubre 2017.

La evaluación de la tolerancia se realizó contando el número de colonias bacterianas en las placas Petri conteniendo medio de cultivo con agar mínimo de sales suplementado con las concentraciones crecientes de petróleo.

**Análisis estadístico.** El diseño experimental fue el bloque completo al azar. Los tratamientos estuvieron conformados por los tres géneros bacterianos aislados (*Pseudomonas* sp, *Alcaligenes* sp y *Bacillus* sp) y tres bloques que fueron las concentraciones (0.1%, 0.5% y 1%), en tal sentido se realizó una prueba de análisis factorial 3 x 3 y pruebas de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), si en caso existiera diferencia estadística significativa, y así determinar la tolerancia bacteriana al petróleo.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

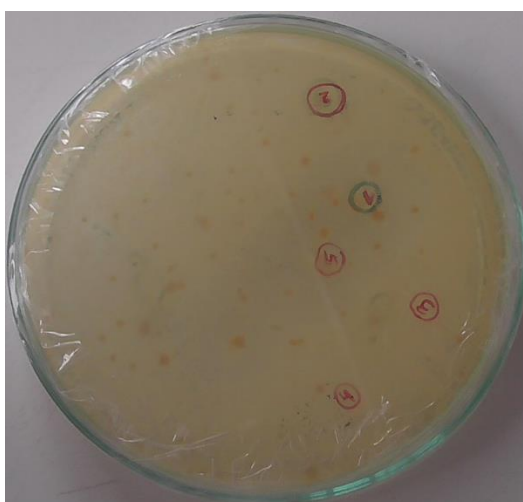
## 4.1 RECUENTO DE BACTERIAS HETERÓTROFAS EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

Los recuentos de bacterias heterotróficas en muestras de suelos de los talleres de mecánica (Figura 15), oscilaron entre 169 y 220 UFC/g de suelo en el taller 1, entre 251 y 289 UFC/g de suelo en el taller 2 y de 127 y 220 UFC/g de suelo en el taller 3, el mayor promedio de recuento bacteriano se obtuvo en suelos del taller 2 (274.67 UFC/g suelo) seguidos del taller 1 (195.33 UFC/g suelo) y 3 (165.33 UFC/g suelo) respectivamente (Tabla 2) y los resultados tuvieron una dispersión leve, inferior al 30% de índice de dispersión (CV).

**Tabla 2.** Recuento de bacterias heterotróficas ( $\times 10^4$  UFC/g) de suelos de tres talleres contaminados con hidrocarburos de la ciudad de Puno, julio – agosto 2017.

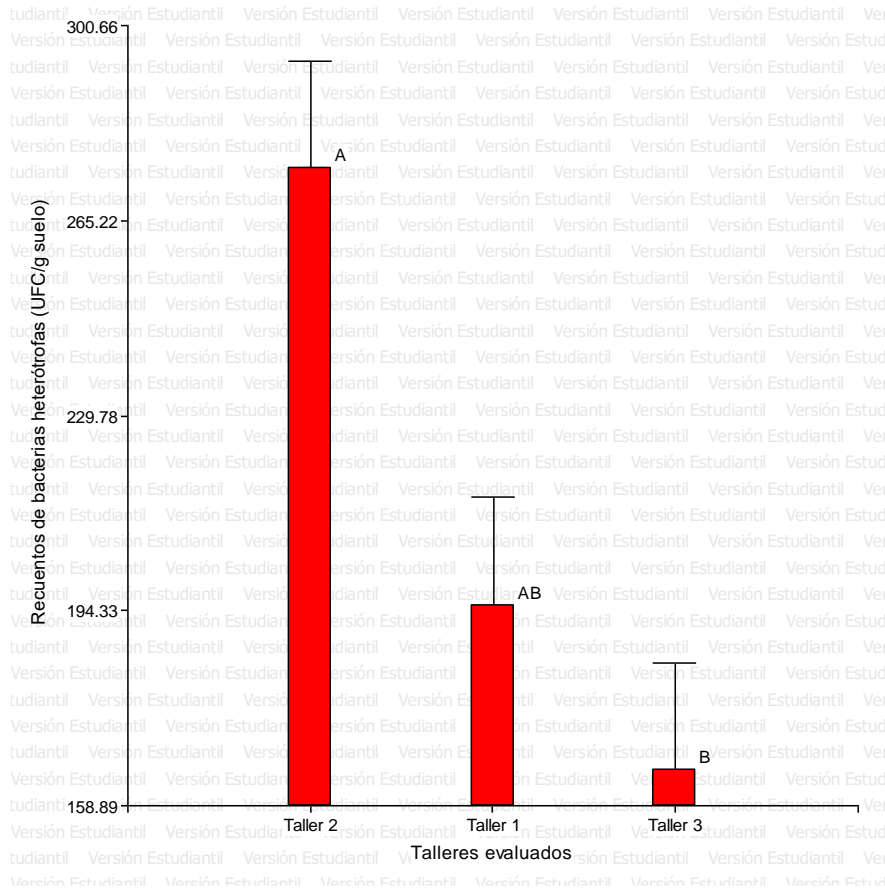
Recuentos bacterianos	Talleres evaluados ( $\times 10^4$ UFC/g)		
	Taller 1	Taller 2	Taller 3
Repetición 1	197	289	127
Repetición 2	169	284	149
Repetición 3	220	251	220
Promedio	195.33	274.67	165.33
D. E.	25.54	20.65	48.60
C. V. (%)	13.08	7.52	29.40

Donde: D. E. desviación estándar y CV coeficiente de variación.



**Figura 15.** Recuento de bacterias heterótrofas en agar APC en suelos de tres talleres de la ciudad de Puno, julio - agosto 2017.

Existió diferencia estadística significativa entre los recuentos de bacterias heterótrofas en muestras de tierra de los tres talleres de mecánica automotriz ( $F=8.35$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0185$ ), siendo mayor en muestras de tierra del taller 2 y menor en los talleres 1 y 3 (Figura 16).



**Figura 16.** Prueba de Tukey de los recuentos de bacterias heterótrofas en suelos de tres talleres de la ciudad de Puno, julio – agosto 2017.

Los recuentos bacterianos fueron superiores en muestras de tierra procedentes del taller 2, llegando a un promedio de 195.33 UFC/g de suelos, dichos hallazgos se constituyen en una fuente adecuada para el aislamiento de microorganismos con mejores capacidades de degradar los hidrocarburos, los mismos que deben ser evaluados *in vitro*, mejorados genéticamente, y posteriormente lograr su aplicación *in situ* para menguar la problemática ambiental (Llenque, 2011), las diferencias en los recuentos bacterianos en los tres talleres de mecánica automotriz, concuerdan con lo mencionado por Latorre (2007), quienes afirman que las densidades de las bacterias heterótrofas presentan una alta variabilidad en los suelos, el cual puede deberse al aumento de las precipitaciones durante este evento, asimismo, carecería de nutrientes o fuente de carbono (factores extrínsecos) o carecen de la capacidad de degradar a los hidrocarburos, caso contrario permitiría el crecimiento y

mantenimiento de una serie de microorganismos del suelo (Chand *et al.*, 1992).

Aunque se considera al suelo como un ambiente rico en nutrientes, es difícil generalizar y por el contrario es altamente heterogéneo, presentando microambientes con bajas concentraciones de nutrientes (Latorre, 2007), por otro lado, según Ferrari *et al.* (2005), el suelo es un sustrato complejo que contiene una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos que suministran condiciones óptimas para el desarrollo de diferentes grupos de microorganismos, a su vez, uno de los grupos predominantes en este ambiente son los microorganismos oligótrofos (Hattori, 1976), quienes desempeñan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica y en la dinámica de nutrientes (Hashimoto *et al.*, 2006).

Los resultados del conteo bacteriano en la investigación fueron inferiores a los obtenidos por Soto *et al.* (2016), quienes, en suelos contaminados con hidrocarburo, en la Costa oriental del Lago de Maracaibo (Venezuela), llegaron a recuentos bacterianos de  $1.8 \times 10^5$  UFC/g y  $2.7 \times 10^5$  UFC/g en la muestra control y de  $10.4 \times 10^5$  UFC/g y  $10.18 \times 10^5$  UFC/g en la muestra experimental con hidrocarburos, así como también a Chirinos *et al.* (2010), que con el fin de evaluar el proceso de degradación de lodos petroquímicos ricos en hidrocarburos, realizaron el estudio de un suelo oxisol del municipio de Lagunillas del estado Zulia (Venezuela, la población bacteriana total estuvo por encima de las  $2 \times 10^5$  UFC/g de suelo y los resultados obtenidos por Rivera *et al.* (2004), quienes en suelos contaminados con petróleo usando el pasto alemán (*Echinochloa polystachya*) las poblaciones máximas fueron de  $16 \times 10^7$  UFC de bacterias/g de suelo seco; y superiores a los reportados por Ojeda *et al.* (2012), quienes en un suelo arcilla – limoso contaminado con hidrocarburos en tres concentraciones de hidrocarburos totales de petróleo, las poblaciones bacterianas finales fueron de  $3.506 \times 10^3$ ,  $4.100 \times 10^3$  y  $3.867 \times 10^3$  UFC/g de suelo, respectivamente.

La presencia de bacterias heterótrofas en las muestras de suelo de los talleres de mecánica automotriz, se debería a que los microorganismos que cohabitan este nicho ejercen un efecto positivo en la disipación, degradación o completa mineralización de compuestos orgánicos como los hidrocarburos (Alarcón & Ferrera, 2013), asimismo, el contenido, la clase y la composición la materia orgánica del suelo depende también de factores ambientales (clima, posición geográfica, temperatura, uso del suelos, entre otros), factores edáficos (humedad, temperatura, pH y aireación) (Mantilla *et al.*, 2000), se puede asumir que la variabilidad del suelo puede proveer diversas condiciones para el desarrollo de

diferentes tipos de microorganismos, lo que se vio reflejado en una buena recuperación con medios bajos y altos en nutrientes.

Los recuentos bacterianos fueron inferiores a varios antecedentes revisados y superior a otros, la presencia de microorganismos en los sustratos de tierra procedentes de un taller de mecánica automotriz, se debería a las nuevas condiciones del ambiente, que en un inicio predominan las bacterias bacilares Gram negativos, y mientras más añejo sea ese suelo con la contaminación de hidrocarburos, predominaron los Gram positivos (Atlas & Bartha, 2002), a su vez, Kaufmann *et al.* (2004), afirman que después de la contaminación con HCP se incrementa la comunidad microbiana y un decrecimiento en la diversidad, quizá por selectividad de algunos organismos capaces de adaptarse y utilizar los nuevos sustratos, ya que los componentes tóxicos de los hidrocarburos podrían inhibir la expresión de algunos miembros de la comunidad bacteriana (Yerushalmi *et al.*, 2003).

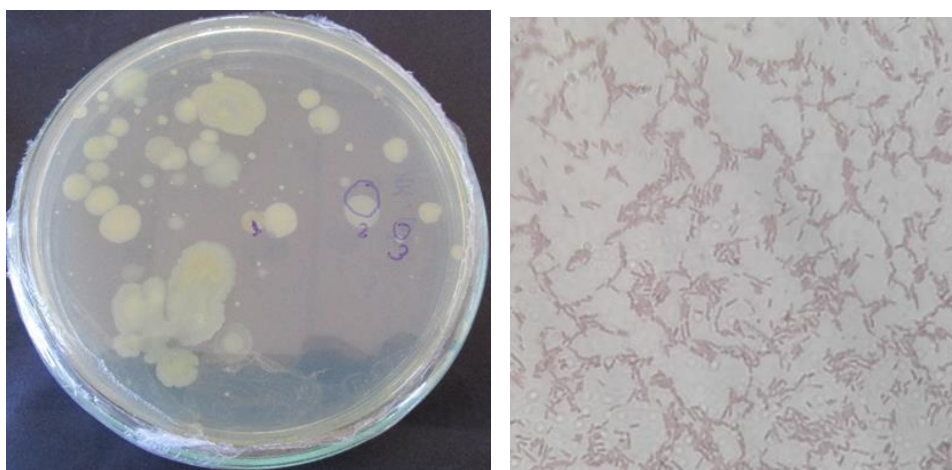
Las colonias bacteriana aisladas en el agar APC (Plate Count) a partir de muestras de suelos de los talleres de mecánica automotriz, son microorganismos heterótrofos que obtienen su energía a causa de los procesos de oxidación de la materia orgánica presente en el suelo (Coyne, 2000), reciclando o mineralizando el material orgánico en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Atlas & Bartha, 2001) y que gracias a sus capacidades metabólicas diversas, son los principales responsables de las actividades de descomposición de la materia orgánica (Lederberg, 2000), ya que también poseen gran diversidad de exigencias que varían desde los hidratos de carbono, los alcoholes y los ácidos orgánicos sencillos hasta la celulosa y la lignina, siendo saprofitos eficaces de sustratos edáficos (Julca *et al.*, 2006).

Las bacterias aisladas de los suelos de los talleres, son microorganismos hidrocarbonoclastos ya que tienen la particularidad de alimentarse exclusivamente de petróleo (Yakimov *et al.*, 2007) y por tanto están adaptados a convivir con la presencia de hidrocarburos como la gasolina, el petróleo, los aceites de motores entre otros hidrocarburos, ya que poseen la habilidad para degradar hidrocarburos y se constituye en uno de los mecanismos principales que poseen determinados ambientes para mitigar el impacto originado por la presencia del petróleo crudo y sus derivados y es el principal mecanismo natural por el cual son removidos de dichos ambientes (Head *et al.*, 2006), la degradación del petróleo lo realizan utilizándolo como única fuente de carbono y energía, la cual es aprovechada para la biorremediación de ambientes terrestres y acuáticos, por tanto las especies y géneros microbianos deben de tener afinidad por ciertos hidrocarburos, como se ha observado en *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Mycobacterium* sp., las

cuales degradan alcanos monoaromáticos y poliaromáticos respectivamente (Salleh *et al.*, 2003).

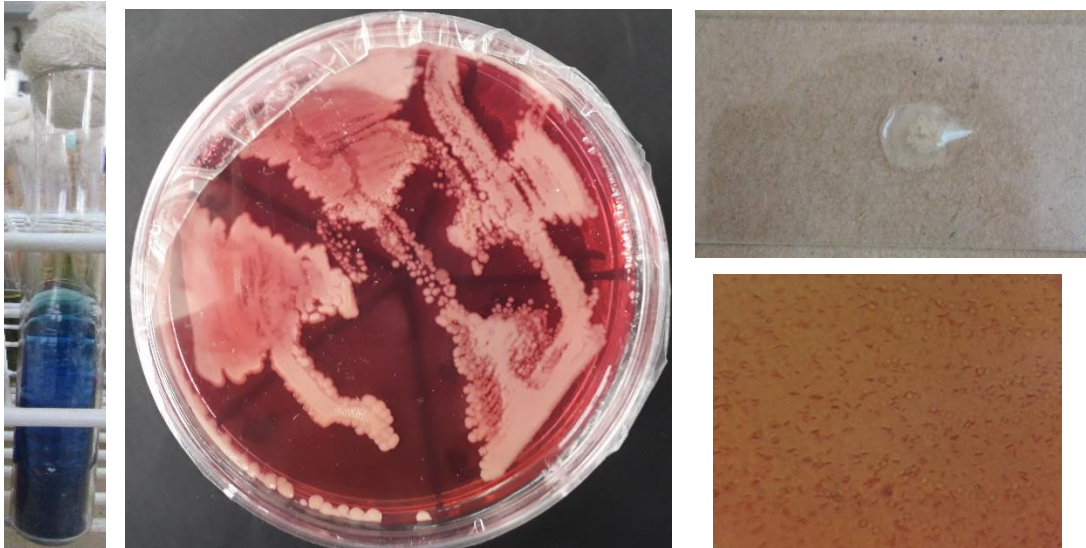
#### 4.2 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS *Pseudomonas*, *Alcaligenes* Y *Bacillus* sp EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

Las bacterias de los géneros *Pseudomonas* sp, *Alcaligenes* sp y *Bacillus* sp, fueron aisladas de las muestras de tierra de los talleres de mecánica automotriz. Las diversas colonias obtenidas a partir de los recuentos en agar APC, fueron inoculadas en placas con medio de cultivo de agar *Pseudomonas*, donde las bacterias del género *Pseudomonas* sp liberan en el medio el pigmento de color azul verdoso, que vendría a ser la piocianina, ya que al medio de cultivo se le agregó glicerol, como fuente de energía y del pigmento (Figura 17, izquierda), asimismo a la tinción fueron bacilos Gram negativos, aerobios, rectos y delgados (Figura 17, derecha).



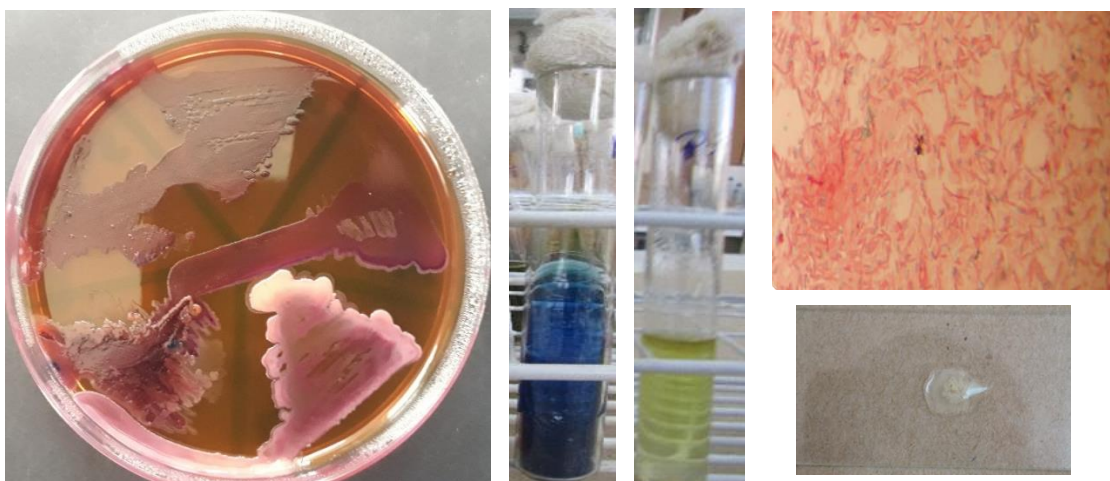
**Figura 17.** Reacciones bioquímicas de bacterias *Pseudomonas* sp en Agar *Pseudomonas* y tinción Gram, laboratorio de Ecología – FCCBB, julio – agosto 2018.

De las diversas colonias obtenidas a partir de los recuentos en agar APC, fueron inoculadas en tubos con agar Citrato Simons, el cual resultó positivo (Figura 18, izquierda), en agar MacConkey las colonias no fermentaron la lactosa ni la glucosa, por lo que tuvieron una coloración entre blanquecina y transparente (Figura 18, centro), por otro lado las colonias fueron catalasa positivo, vale decir que producen la catalasa para desdoblar el peróxido de hidrógeno y finalmente a la tinción Gram, resultaron ser Gram negativas (Figura 18, derecha), todas estas características no llevaron a identificar a la colonia bacteriana perteneciente al género *Alcaligenes* sp.



**Figura 18.** Reacciones bioquímicas de bacterias *Alcaligenes* sp en Agar Citrato, MacConkey, prueba de catalasa y tinción Gram, laboratorio de Ecología – FCCBB, julio – octubre 2018.

De las colonias obtenidas a partir de los recuentos en agar APC, fueron inoculadas en agar MacConkey las colonias no fermentaron la lactosa, por lo que tuvieron una coloración blanquecina (Figura 19, izquierda), por otro lado las colonias fueron citrato positivas, Indol negativas (Figura 19, centro), fueron catalasa positivo para desdoblar el peróxido de hidrógeno y finalmente a la tinción Gram, resultaron ser Gram negativas (Figura 19, derecha), todas estas características no llevaron a identificar a la colonia bacteriana perteneciente al género *Bacillus* sp.



**Figura 19.** Reacciones bioquímicas de bacterias *Bacillus* sp en Agar MacConkey, Citrato Simons, reacción de Indol, tinción Gram y prueba de la catalasa, laboratorio de Ecología – FCCBB, julio – agosto 2018.

Las tres bacterias aisladas en la investigación, se encuentran presentes en suelos donde hay presencia de vertimiento de hidrocarburos derivados del petróleo, concordando con lo mencionado con Soto *et al.* (2016), quienes reportan la flora microbiana aislada de un suelo contaminado con hidrocarburo (Maracaibo – Venezuela), donde aislaron bacterias del género *Bacillus*, Llenque (2011), aisló cultivos bacterianos de suelos de oleocentros de la ciudad de Trujillo (Perú), correspondientes al género *Pseudomonas* sp, y Echeverry *et al.* (2010), aislaron bacterias en afueras de la industria petroquímica en la Bahía de Cartagena (Colombia), con morfotipos identificados como *Pseudomonas aeruginosa*, corroborando su gran capacidad de adaptación en ambientes contaminados de este tipo, (biodegradación).

Por otro lado, Chirinos *et al.* (2010), al estudiar un suelo del municipio Lagunillas del estado Zulia (Venezuela), aislaron bacterias *Pseudomonas* sp y *Alcaligenes* sp, donde se adaptaron de manera aceptable ante las condiciones de alta concentración de hidrocarburos; dos de los géneros bacterianos *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp, coinciden con lo reportado por Narváez *et al.* (2008), quienes a partir de sedimentos del Caribe colombiano identificaron 11 cepas entre ellas a *Pseudomonas* y *Bacillus*, pero tienen un potencial enzimático para degradar hidrocarburos y es necesario caracterizarlas a nivel molecular con el fin de formular un consorcio que sea efectivo para la aplicación en campo.

Las bacterias de los géneros *Pseudomonas* sp, *Alcaligenes* sp y *Bacillus* sp, presentes en muestras de tierra de los talleres de mecánica automotriz, habitan estos lugares debido a que poseen la capacidad de utilizar hidrocarburos, mostrando que estos microorganismos se desarrollan a partir de estos y son de similares características, otros autores las denominan bacterias hidrocarbonoclastas ya que tienen la particularidad de alimentarse exclusivamente de petróleo, utilizándolo como única fuente de carbono y energía, y por tanto juegan un papel muy importante en la biodegradación del petróleo ya que conforman hasta un 90% de las especies encontradas en las zonas contaminadas (Yakimov *et al.*, 2007).

Su presencia en áreas contaminadas con hidrocarburos, hacen de suponer que tendrían la capacidad de metabolizar sus componentes químicos, y por tanto lograr la remoción de los hidrocarburos que involucra procesos fisicoquímicos, los cuales se lleva a cabo bajo condiciones aerobias, anaerobias o ambas, constituyéndose en una alternativa al tratamiento químico debido a que resultan ser estrategias muy costosas y difíciles de llevar a cabo (Shan, 2002), por el contrario, el uso de microorganismos es una opción viable por

su variable bioquímica y molecular y ser una tecnología sencilla, de bajo costo y compatible con el medio ambiente (Kleerebezem *et al.*, 1999), donde el uso de los microorganismos permite el consumo de menos energía, ofreciendo posibilidades de reciclaje y ser más específicos.

#### 4.3 TOLERANCIA *in vitro* DE BACTERIAS AISLADAS EN CONCENTRACIONES CRECIENTES DE PETRÓLEO

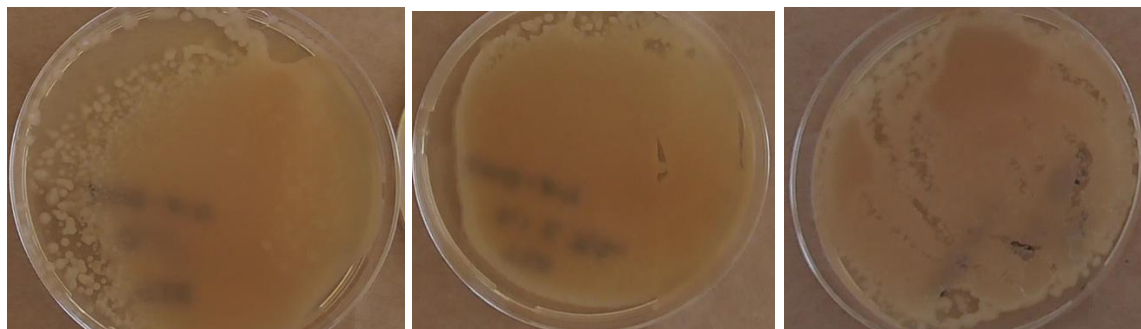
Las bacterias aisladas de los géneros *Pseudomonas* sp, *Alcaligenes* sp y *Bacillus* sp, presentaron un buen crecimiento de colonias en medios de cultivo de agar TSA conteniendo 0.1%, 0.5% y 1% de petróleo, la bacteria *Pseudomonas* sp, presentó un promedio de 209.67 colonias, seguido de 179.33 colonias y 186.33 colonias en concentraciones de 0.1%, 0.5% y 1% respectivamente, como se observa la tendencia es que mientras mayor es la concentración del petróleo en el medio, el recuento de colonias disminuye, de igual manera las bacterias *Bacillus* sp, presentó recuentos promedios de 258.33, 123.33 y 109.33 colonias sobre concentraciones de 0.1%, 0.5% y 1% respectivamente; mientras tanto que la bacteria *Alcaligenes* sp, presentó recuentos promedios de 267.33, 269.33 y 305.33 colonias a concentraciones de 0.1%, 0.5% y 1% respectivamente (Tabla 3), los recuentos de colonias se mantuvieron sin disminuir su número cuando incrementaron la concentración de petróleo.

**Tabla 3.** Recuento de colonias bacterianas en medio TSA conteniendo 0.1%, 0.5% y 1% de petróleo a partir de una solución de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml, laboratorio de Ecología – FCCBB, setiembre – octubre 2017.

Bacterias aisladas	Concentraciones de petróleo	Recuento de colonias ( $\times 10^8$ UFC/ml)			Promedio	CV (%)
		Rep 1	Rep 2	Rep 3		
<i>Pseudomonas</i> sp	0.1%	226	205	198	209.67	6.95
	0.5%	186	172	180	179.33	3.92
	1%	170	188	201	186.33	8.35
<i>Alcaligenes</i> sp	0.1%	264	271	267	267.33	1.31
	0.5%	250	268	290	269.33	7.44
	1%	298	317	301	305.33	3.35
<i>Bacillus</i> sp	0.1%	250	284	241	258.33	8.78
	0.5%	112	136	122	123.33	9.77
	1%	98	105	125	109.33	12.82

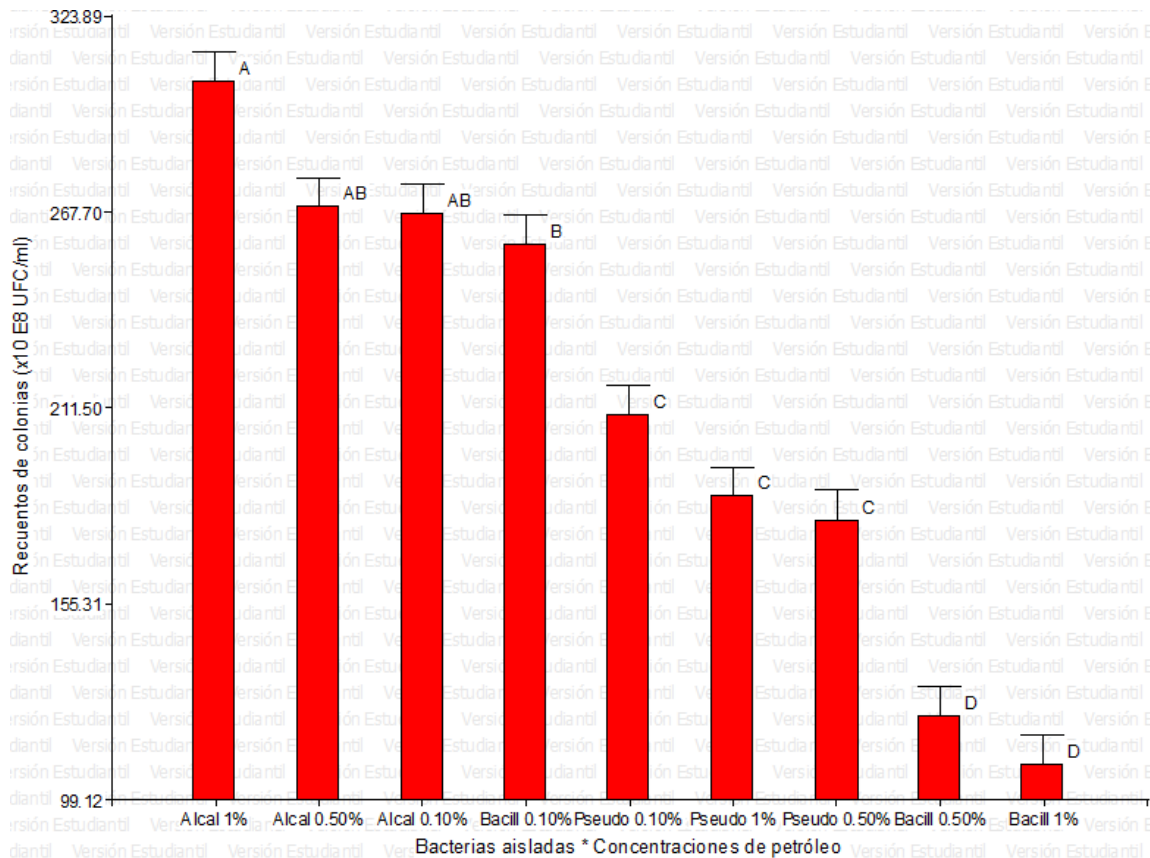


El crecimiento de bacterias en especial las del género *Alcaligenes* sp, fueron las que presentaron el mayor número de colonias (Figura 20), a diferencia de las demás colonias bacterianas que tendían a disminuir su número mientras incrementaba la concentración de petróleo en el medio.



**Figura 20.** Crecimiento de colonias bacterianas a 0.1% (izquierdo), 0.5% (centro) y 1% (derecha) de petróleo en agar TSA, laboratorio de Ecología – FCCBB, setiembre – octubre 2017.

Por otro lado, el análisis estadístico mostró los siguientes resultados: el número de colonias de bacterias presentó diferencia estadística significativa ( $F=160.88$ ;  $gl=2$ ;  $P<0.0001$ ), donde el mayor número de colonias lo presentó la bacteria *Alcaligenes* sp con un promedio de 280.67 colonias, a continuación se encuentra *Pseudomonas* sp con 191.78 colonias y finalmente *Bacillus* sp con 163.67 colonias; así también el número de colonias según las tres concentraciones experimentadas presentó diferencia estadística significativa ( $F=36.39$ ;  $gl=2$ ;  $P<0.0001$ ), donde los mayores recuentos de colonias se determinó a concentraciones de 0.1% con 245.11 colonias, seguidas de la concentración 1% y 0.5% con 200.33 y 190.67 colonias respectivamente, estas dos últimas no presentaron diferencia estadística significativa. Observando las interacciones de los géneros bacterianos y las concentraciones de petróleo, los mayores recuentos de colonias fueron de las bacterias *Alcaligenes* sp, seguidos de *Bacillus* sp al 0.1%, la bacteria *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp al 0.5% y 1% (Figura 21).



**Figura 21.** Prueba de Tukey del recuento de colonias de tres bacterias aisladas según concentración en el medio de cultivo, laboratorio de Ecología – FCCBB, setiembre – octubre 2017.

Las bacterias del género *Alcaligenes* sp superaron el recuento de colonias a *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp respectivamente, lo cual concuerda con Chirinos *et al.* (2010), quienes evaluaron el proceso de degradación de lodos petroquímicos ricos en hidrocarburos, en Zulia (Venezuela), y en ella los resultados mostraron que las bacterias del género *Alcaligenes* se desempeñaron mejor y se adaptaron de manera aceptable ante las condiciones de alta concentración de hidrocarburos al contrario de las *Pseudomonas*, por otro lado Soto *et al.* (2016), en un suelo contaminado con hidrocarburo (Maracaibo – Venezuela), aislaron bacterias del género *Bacillus* que alcanzaron recuentos bacterianos mayores en ambientes experimentales con hidrocarburos, logrando inclusive remover el contaminante al primer mes de ensayo en un 27% y al sexto mes en un 66%, Llenque (2011), reportó el crecimiento de bacterias *Pseudomonas* sp en caldo de soya triptica, sales biliares y petróleo al 1%, Echeverry *et al.* (2010), en el ecosistema marino cerca de la industria petroquímica (Cartagena – Colombia), aisló a *Pseudomonas aeruginosa*, y determinó su capacidad de adaptación en ambientes contaminados de este tipo, mediante la biodegradación.

Adicionando, Narváez *et al.* (2008), a partir de sedimentos del Caribe colombiano suplementados con hidrocarburos (petróleo crudo), en diferentes concentraciones (1 – 8% v/v), identificaron entre todas las cepas a *Pseudomonas sp* y *Bacillus sp*, ya que poseen un potencial enzimático para degradar hidrocarburos y utilizarlos como fuente de carbono y nitrógeno, de esta manera tolera la presencia de contaminantes en su hábitat y es necesario caracterizarlas a nivel molecular con el fin de formular un consorcio que sea efectivo para la aplicación en campo, lo cual se constituiría motivo de futuras investigaciones, a su vez, Cabranes *et al.* (2006), experimentaron la aplicación de bacterias degradadoras de hidrocarburos en las especies *Bacillus alcalophilus* cepa CBM-225 y *Bacillus licheniformis* cepa CBM-60, ésta última presentando mayor velocidad específica de crecimiento máxima y afinidad por el n-hexadecano, inclusive no reflejando inhibición de su crecimiento hasta los 60 g/L de concentración del hidrocarburo, la cepa CBM-225 se inhibió a partir de los 23 g/L de concentración de éste, difiriendo las concentraciones con la presente investigación.

Las bacterias *Alcaligenes sp*, fueron las más tolerantes a las tres concentraciones de petróleo experimentadas, que las otras dos bacterias (*Pseudomonas sp* y *Bacillus sp*), en líneas generales los tres géneros bacterianos presentaron la capacidad de tolerar el petróleo, eso se debería a que poseen una amplia variedad de enzimas para la oxidación inicial de los compuestos hidrocarbonados por ulterior formación de los productos intermedios (catecol y protocatehuate) y la ruptura de los anillos aromáticos (Kasak *et al.*, 1993), donde las enzimas dioxigenasas, son las principales que se expresan durante la biodegradación de los hidrocarburos aromáticos, también conocidas como ferroproteínas del grupo no hemo, éstas enzimas llevan a cabo la hidroxilación de los hidrocarburos aromáticos en presencia de oxígeno y NADH (Bagnèris *et al.*, 2005), donde se llevan a cabo la transferencia de electrones, activando las enzimas que se unen al sustrato (petróleo), activando la región promotora de los operones catalíticos (Witzig *et al.*, 2006).

Otra proteína que participa en la degradación de los anillos aromáticos, es la enzima benceno deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>, necesaria para convertir el cis-benceno dihidrodiol en catecol (Fong *et al.*, 1996); otras bacterias poseen también las enzimas dioxigenasas, tales como *E. coli*, por lo que Hendrickx *et al.* (2006), demostraría una alta similitud entre sus secuencias aminoacídicas, lo cual indica que estas proteínas posiblemente provienen de un gen ancestral común bacteriano, vale decir que las bacterias aisladas están emparentadas entre sí. Las enzimas monooxigenasas, posee una estructura

proteica similar al sistema multienzimático de las dioxigenasas, por lo que son también llamadas también hidroxilasas y catalizan la transferencia de oxígeno al sustrato utilizando NADH o NADPH como agente reductor, Harayama *et al.* (1986) indican que la enzima xileno monooxigenasa, está relacionada con la degradación del xileno, y está formada por dos componentes proteicos la xylM y la xylA, la primera está relacionada con la enzima alcano-hidroxilasa, mientras que el componente xylA es similar a las ferredoxinas reductasas, Sabirova *et al.* (2006) reportan que el metabolismo aerobio de los alcanos se lleva a cabo primero por la oxidación de estos en donde participan las enzimas monooxigenasas, todas las proteínas son expresadas a partir de genes catabólicos que forman parte de un operón.

Por lo tanto, las tres bacterias aisladas *Pseudomonas sp*, *Alcaligenes sp* y *Bacillus sp*, poseerían similares genes relacionados a la tolerancia y porque no afirmar a la capacidad de degradar los hidrocarburos, ya que expresan la formación o síntesis de las enzimas monooxigenasas y dioxigenasa, y como se sabe estos proceden de los operones presentes en sus cromosomas. También vale decir de que existió una diferencia de tolerancia de las bacterias, esto se debería a que los talleres varían en su tiempo de funcionamiento, y que las bacterias con mayor tiempo de supervivencia en dichos suelos, se podrían haber adaptado a dichas condiciones de contaminación por hidrocarburos, debido a la expresión de genes para su tolerancia ante dicha contaminación, mediante la producción de enzimas con capacidad de degradar a los hidrocarburos.

## V. CONCLUSIONES

- La carga de bacterias heterótrofas presentes en las muestras de suelo de los talleres de mecánica automotriz de la ciudad de Puno, oscilaron entre 197 y 220 UFC/g de suelo en el taller 1, entre 251 y 289 UFC/g de suelo en el taller 2 y de 127 y 220 UFC/g de suelo en el taller 3, presentando diferencia estadística significativa entre los recuentos ( $F=8.35$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0185$ ), siendo mayor en muestras de suelo del taller 2.
- Las bacterias de los géneros *Pseudomonas* sp, *Alcaligenes* sp y *Bacillus* sp, se encuentran presentes en las muestras de suelo de los talleres de mecánica automotriz, variando su presencia entre los talleres evaluados.
- La tolerancia *in vitro* de la bacteria *Pseudomonas* sp, varió según la concentración del petróleo en el medio de cultivo, llegando a formar 186 colonias al 1% de petróleo; las bacterias del género *Bacillus* sp, produjeron 109 colonias en medios de cultivo con el 1% de petróleo; mientras tanto que la bacteria *Alcaligenes* sp, presentó recuentos de 305 colonias en medios de cultivo al 1% de petróleo, siendo las más tolerantes a la concentración de petróleo experimentada ( $F=160.88$ ;  $gl=2$ ;  $P=0.0001$ ).

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar investigaciones de degradación de petróleo *in vitro*, cuantificando la concentración inicial y final de petróleo presente en un medio de cultivo líquido, variando los valores de pH, temperatura y sustancias contaminantes.
- Realizar la evaluación fisicoquímica (pH, temperatura, tipo de suelo, conductividad eléctrica, entre otros) de las muestras de suelo procedentes de los talleres de mecánica automotriz para ampliar los conocimientos del hábitat de los microorganismos tolerantes a los hidrocarburos.

## VII. REFERENCIAS

- Acuña K., Englande J., Alfaro F., Rodríguez H., De Lira Reyes G., Marmolejo G. *et al.* (2003). Evaluation of BTEX biodegradation in liquid and vapor phase in soil slurries. In: CONSOIL 2003, Remediation Technologies. G.J. Annokké, F. Arendt, O. Uhlmann (eds.). Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Publishers. Alemania. p. 2284 – 2290.
- Adams M. (1995). Fundamentos de química de suelos. Colección Estudios Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 390 p.
- Adams R., Zavala J. & Morales F. (2008). Concentración residual de hidrocarburos en el suelo del trópico. II: Afectación a la fertilidad y su recuperación. Vol. 33: 483 – 348.
- Adrián P. (2010). Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Vol. 8.
- Agnello C., Bagard M., VanHullebusch D., Esposito G. & Huguenot D. (2016). Comparative bioremediation of heavy and petroleum hydrocarbons co – contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. Science of the Total Environment. Vol. 564: 693 – 703.
- Alarcón A. & Ferrera R. (2013). Biorremediación de suelos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos. Editorial Trillas. México. 333 p.
- Alkorta I., Aizpurua A., Riga P., Albizu I., Amezaga I. & Garbizu C. (2003). Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. Review Environmental Health. Vol. 18: 65 – 73.
- Aranda I., Ramos J. & Marqués S. (2005). Integration of Signals through Crc and PtsN in Catabolite Repression of *Pseudomonas putida* TOL Plasmid pWW0. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 71 (8): 4191 – 4198.
- Atlas M. & Bartha R. (2002). Ecología Microbiana y microbiología ambiental. Cuarta Edición. Addison Wesley. Nueva York – USA.
- Atlas M. (1981). Microbial degradation of hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiological Reviews. Vol. 45 (1): 180 – 209.
- Atlas R. (1995). Media for environmental microbiology. University of Louisville.
- Bagnéris C., Cammack R. & Mason J. (2005). Subtle difference between benzene and toluene dioxygenases of *Pseudomonas putida*. Appl Environ Microbiol. Vol. 71 (3): 1570 – 1580.
- Balestra G. & Misaghi I. (1997). Increasing the efficiency of the plate counting method for estimating bacterial diversity. Journal Microbiological Methos. Vol. 30 (2): 111 – 117.

- Bartha R. & Atlas R. (1977). The microbiology of aquatic oil spill. *Advances in Applied Microbiology*. Vol. 22: 225 – 266.
- Benavides L., Quintero G., Guevara L., Jaimes A., Gutiérrez M. & García J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA Publicación científica*. Vol.4 (5).
- Britton L. (1984). Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: D. Gibson (Ed.) *Microbial Degradation of Organic Compounds*. Microbiology Series. Vol. 13. Marcel Dekker. New York.
- Cabranes Y., Núñez R., Martínez J. & Ortiz E. (2006). Bacterias del género *Bacillus* degradadoras de N – hexadecano aisladas del sedimento marino: Parámetros cinéticos. *Rev. Invest. Mar.* Vol. 27 (3): 183 – 189.
- Caravaca F. & Roldán A. (2003). Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid mediterranean condition. *Geoderma*. Vol. 117: 53 – 61.
- Casal J. & Mateu E. (2003). Tipos de muestreo. *Rev. Epidem. Med. Prev.* Vol. 1: 3 – 7.
- Cerdan P., Wasserfallen A., Rekik M., Timmis K. & Haramaya S. (1994). Substrate specificity of catechol 2,3-Dioxygenase encoded by TOL Plasmid pWVWO of *Pseudomonas putida* and its relationship to cell growth. *J. Bacteriol.* Vol. 17 (19): 6074 – 6081.
- Chakraborty R. & Coates J. (2004). Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 64: 437 – 446.
- Chan G., Ochoa S. & Pérez I. (2012). Germinación y sobrevivencia de especies arbóreas que crecen en suelo contaminados por hidrocarburos. Universidad de Quintana Roo unidad Cozumel. *Teoría y Praxis*. p. 102 – 119.
- Chand T., Harris R. & Andrews J. (1992). Enumeration and characterization of bacterial colonists of a submersed aquatic plant, Eurasia watermilfoil (*Myriophyllum spicatum* L). *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 58 (10): 3374 – 3379.
- Chirinos I., Larreal M. & Díaz J. (2010). Biorremediación de lodos petroquímicos mediante el uso de la biota microbiana autóctona en un oxisol del municipio Lagunillas del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*. Venezuela. Vol. 10 (1).
- Cooper A. & Skinner M. (1980). Catabolism of 3- and 4-hydroxyphenylacetate by the 3,4-dihydroxyphenylacetate pathway in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* Vol. 143: 302 – 306.
- Coyne M. (2000), *Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio*. Primera Edición. Editorial Paraninfo S. A. Madrid – España.
- Das N. & Chandran P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon



- contaminants: An Overview. *Biotechnol. Reserch. Internal*. Vol. 2011: 13.
- De la Cruz Rodríguez A. (2007). *Química Orgánica Vivencial. Síntesis*. McGraw Hill.
- Hidrocarburos en el Perú. (8 de junio del 2012). Obtenido de <http://www.loshidrocarburoselperu.org/2012/06/que-son-los-hidrocarburos/>
- Díaz E., Fernández A., Prieto M., García J. (2001). Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Vol. 65 (4): 523 – 569.
- Echeverry G., Manjarrez G. & Cabrera M. (2010). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *Nova – Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. Colombia*. Vol. 8 (13): 76 – 86.
- Ferrari B., Binnerup S. & Gillings M. (2005). Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72 (12): 8714 – 8720.
- Fong K., Goh C. & Tan H. (1996). Characterization and expression of the plasmid-borne *bedD* gene from *Pseudomonas putida* ML2, which codes for a NAD1-dependent cisbenzene dihydrodiol dehydrogenase. *J. Bacteriol.* Vol. 178 (19): 5592 – 5601.
- Forbes B., Sahm D. & Weissfeld A. (2009). *Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. 12ava edición. Buenos Aires – Argentina. 1026 p.
- Gibson T. & Subramanian V. (1984). Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. p. 181 – 252. In D. T. Gibson (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, New York.
- González M., Ramos J. & Marqués S. (2004). Cellular XylS Levels are a function of Transcription of *xylS* from two independent promoters and the differential efficiency of Translation of the Two mRNAs. *J. Bacteriol.* Vol. 186 (6): 1898 – 1901.
- González N., Simarro R., Molina C., Bautista F., Delgado L. & Villa A. (2011). Effect of surfactants on PAH biodegradation by a bacterial consortium and on the dynamics of the bacterial community during the process. *Bioresource Technology*. Vol. 102: 9438 – 9446.
- Harayama S., Rekik M. & Timmis K. (1986). Genetic analysis of a relaxed substrate specificity aromatic ring dioxygenase, toluate 1,2-dioxygenase, encoded by TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida*. *Mol. Gen. Genet.* Vol. 202: 226 – 234.
- Hashimoto T., Whang K. & Nagaoka K. (2006). A quantitative evaluation and phylogenetic characterization of oligotrophic denitrifying bacteria harbored in subsurface upland soil using improved culturability. *Biology Fertility Soils*. Vol. 42 (3): 179 – 185.
- Hattori T. (1976). Plate count of bacteria in soil on a diluted nutrient broth as a culture medium. *Reports of the Institute for Agricultural Research, Tohoku University*. Vol.

27: 23 – 30.

- Hazen R., Dubinsky E., DeSantis T., Andersen G., Piceno P., Singh N. *et al.* 2010. Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. *Science*. Vol. 330: 204-208.
- Head M., Jones D. & Röling W. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Microbiology*. Vol. 4: 173 – 182.
- Hendrickx B., Junca H., Vosahlova J., Lindnere A., Ruegg I, Bucheli M. *et al.* (2006). Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *J. Microbiol. Meth.* Vol. 64: 250 – 265.
- MINEM, Ministerio de Energía y Minas – Perú. 2012. Hidrocarburos en el Perú. Lima – Perú.
- Inouye S., Nakazawa A. & Nakazawa T. (1981). Molecular cloning of gene *xyIS* of the TOL plasmid: evidence for positive regulation of the *xyIDEGF* operon by *xyIS*. *J. Bacteriol.* Vol. 148: 413 – 418.
- Jiang Y., Parales R., Lynch N. & Gibson D. (1996). Site-directed mutagenesis of conserved amino acids in the alpha subunit of toluene dioxygenase: potential mononuclear non-heme iron coordination sites. *J. Bacteriol.* Vol. 178: 3133 – 3139.
- Jiménez L. (2006). Estudio de impacto ambiental generado por un derrame de hidrocarburos sobre una zona estuarina, aledaña al terminal de ecopetrol en Tumaco. Tesis de pregrado. Ingeniería Ambiental Sanitaria. Universidad de la Salle. Bogotá – Colombia.
- Joseph S., Hugenholtz P., Sangwan C. & Janssen P (2003). Laboratory cultivation of widespread and previously unculturable soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69: 7210 – 7215.
- Julca A., Meneses L. Blas R. & Bello S. (2006). La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia*. Vol. 24: 49 – 51.
- Karimi S. Pickard M. & Gray M. (1996). Reactions of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil. *Environmental Science Technology*. Vol. 30: 1145 – 1151.
- Kasak. L., Horak R., Nurk A., Talvik K. & Kivisaar M. (1993). Regulation of catechol 1,2 dioxygenases and phenol monooxygenases encoding *pheBA* operon in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* Vol. 175 (24): 8038 – 8042.
- Kaufmann K. Christophersen M., Buttler A., Harms H. & Hohener P. (2004). Microbial community response to petroleum hydrocarbon contamination in the unsaturated zone at the experimental field site Vaerlose, Denmark. *FEMS Microbiology Ecology*.

Vol. 48: 387 – 399.

- Kim D., Chae J., Zylstra G., Kim Y., Kim S., Nam M., Kim Y. & Kim E. (2004) Identification of a novel dioxygenase involved in metabolism of o-xylene, toluene, and ethylbenzene by *Rhodococcus* sp. Strain DK17. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 70 (12): 7086 – 7092.
- Kleerebezem R., Pol L. & Lettinga G. (1999). Anaerobic degradation of phthalate isomers by methanogenic consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65: 1152 – 1160.
- Knight K., Kerkhof L. & Häggblom M. (1999). Community analyses of sulfidogenic 2-bromophenol-dehalogenating and phenol-degrading microbial consortia, *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 29: 137 – 147.
- Kostka J., Prakash E., Overholt O., Green W., Freyer J., Canion G. *et al.* (2011). Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacteria community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by Deepwater Horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 77 (22): 7962 – 7964.
- Kumar R., Kapur M., Labanal S., Lal B., Sarma P., Bhattacharya D. & Thakur I. (2005). Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Curr Sci.* Vol. 89 (1): 101 – 112.
- Latorre N. (2007). Evaluación de medios de cultivo altos y bajos en nutrientes para la recuperación de heterótrofos edáficos en la ecorregión cafetalera de los Andes. Tesis de Microbiólogo Industrial. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia. 104 p.
- Leahy J. & Colwell R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* Vol. 54 (3): 305 – 315.
- Lederberg J. (2000). *Enciclopedia of microbiology*. Second edition. Ed. Academi Press. California – USA.
- Lee H., Byun G., Kim O., Hwang S. & Park J. (2006). Monitoring biodegradation of diesel fuel in bioventing processes using in situ respiration rate. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 53 (4-5): 263 – 272.
- Lee K. & Lee B. (2001) Isolation and characterization of a thermotolerant bacterium *Ralstonia* sp. strain PHS1 that degrades benzene, toluene, ethylbenzene, and oxylene. *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol. 56: 270 – 275.
- Leisinger T. & Brunner W. (1986). Poorly degradable substances. p. 475 – 513. In H. J. Rehm and G. Reed (ed.), *Biotechnol.* Vol. 8. VCH Publishers, New York.
- Lizárraga L., Izquierdo F. & Wong I. (1990). Marine oil degrading bacteria related to oil inputs and surface currents in the western Caribbean sea. *Oil Chemical. Pollution.*,

Vol. 7: 271 – 281.

- Lizárraga M., Porrás L. & Izquierdo F. (1983). Tasa bacteriana hidrocarbonoclasticas / heterótrofas como índice de impacto ambiental por petróleo crudo en la sonda de Campeche. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. Vol. 10: 177 – 185.
- Llenque L. (2011). Aislamiento e identificación de bacterias heterótrofas de suelos contaminados con petróleo provenientes de oleocentros de la ciudad de Trujillo, Perú. *Revista REBIOL*. Vol. 31 (2).
- Madigan M., Martinko J. & Parker J. (2001). *Biología de los microorganismos*. Octava edición. Ed. Prentice Hall. Madrid – España.
- Maldonado E., Rivera M., Izquierdo F. & Palma D. (2010). Efectos de rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Revista UCiencia Trópico Húmedo*. México. Vol. 26 (2).
- Mantilla G., de Latorre S., Gómez C., Ordóñez N., Ceballos J., Euscategui C., Pérez P., Pérez S., Martínez N., Sánchez R., Maldonado N., Gaitán J., Chávez L., Chamorro C. & Flórez A. (2000). *El medio ambiente en Colombia*. Cap. 6. Los suelos: estabilidad, productividad y degradación. Publicación del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM).
- Martínez V. & López F. (2001). Efecto de los hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de un suelo arcilloso. *Terra*. Vol. 19: 9 – 17.
- Mascarelli A. (2010). Debate grows over impact of dispersed oil. *Nature*.
- Mc Faddin J. (1991). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. México DF. Editorial Médica Panamericana.
- Mendelssohn A., Andersen L., Baltz D., Caffey R., Carman K., Fleeger J., Joye B., Lin Q., Maltby E., Overton B. & Rozas L. (2012). Oil Impacts on Coastal Wetlands: Implications for the Mississippi River Delta Ecosystem after the Deepwater Horizon Oil Spill. Vol. 62: 562 – 574.
- Merck. (2004). *Manual de Medios de cultivo*. Darmstadt – Alemania.
- Miranda M., Delgadillo J., Alarcón A. & Ferrera R. (2007). Degradación de fenantreno por microorganismos en la rizósfera del pasto alemán. *Revista Terra Latinoamericana*. México. Vol. 25 (1).
- Morris A. (1997). *Biotratamientos de residuos tóxicos y peligrosos*. Editorial Mc Graw Hill. Interamericana. Madrid – España.
- Morris L., Henneberger R., Huber H., & Moissl C. (2013). Microbial syntrophy: interactions for the common good. *fems Microbiology Reviews*. Vol. 37: 384 – 406.

- Mortazavi B., Horel A., Beazley A., & Sobecky P. (2013). Intrinsic rates of petroleum hydrocarbon biodegradation in Gulf of Mexico intertidal sandy and its enhancement by organic substrates. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 244: 537 – 544.
- Narváez S., Gómez M. & Martínez M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del Caribe Colombiana. *Bol. Invest. Mar. Cost. Santa Marta – Colombia*. Vol. 37 (1): 61 – 75.
- Navarro G. (2000). *Química agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal*. Segunda edición. Ed. Mundi Prensa. España.
- Ñustez C. (2012). Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible. *Revista Tecnológica de Ingeniería*. Vol. 37.
- Ojeda M., Hernández M., Martínez J., Díaz L. & Rivera M. (2012). Tres dosis inoculantes con *Proteus* sp en la biodegradación de petróleo crudo. *Rev. Int. Contam. Ambie. México*. Vol. 28 (4).
- Okolo C., Amadi E. & Odu C. (2005). Effects of soil treatments containing poultry manure on crude oil degradation in a sandy loam soil. *Applied Ecology and Environmental Research*. Vol. 3 (1): 47 – 53.
- Osuji C. & Opiah C. (2007). Hydrocarbon contamination of a terrestrial ecosystem: the case of Oshire-2 oil spill in Niger Delta, Nigeria. *Environmentalist*. Vol. 27: 337 – 340.
- Osuji C., Egbuson E. & Ojinnaka C. (2005). Chemical reclamation of crude-oil contaminated soils from Niger Delta, Nigeria. *Chemistry and Ecology*. Vol. 21 (1): 1 – 10.
- Pignatello J. & Xing B. (1996). Mechanisms of sorption of organic chemicals to natural particles. *Environmental Science Technology*. Vol. 30: 1 – 11.
- Pucci N., Acuña A., Tonin N. & Pucci C. (2010). Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa de Caleta Córdova, Argentina. *Revista Peruana de Biología*.
- Ramos L., Mermod N. & Timmis K. (1987). Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding meta cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol*. Vol. 1: 293 – 300.
- Rittmann B. (2001). *Biotecnología del medio ambiente. Principios y aplicaciones*. España McGraw – Hill.
- Rivera M., Ferrera R., Sánchez R., Volke V., Fernández L. & Rodríguez R. (2004). Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán (*Echinochloa polystachya* H. B. K. Hitchc.). *Revista Agrociencia*. México. Vol. 38 (1).
- Rivera M., Ferrera R., Volke V., Rodríguez R. & Fernández L. (2002). Adaptación y

- selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Revista Terra*. Vol. 20.
- Sabirova S., Ferrer M., Regenhardt D., Timmis K. & Golyshin P. (2006). Proteomic Insights into Metabolic Adaptations in *Alcanivorax borkumensis* Induced by Alkane Utilization. *J. Bacteriol.* Vol. 188 (11): 3763 – 3773.
- Salleh B., Ghazali F., Rahman R. & Basri M. (2003). Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. *Indian Journal of Biotechnology*. Vol. 2: 411 – 425.
- Sarubbi A. (2000). Aspectos importantes en biorremediación. AIDIS Argentina. Página web: <http://www.aidisar.org>. Consultado el 15 ene. 2004.
- Scholz B.M., Ahlf S., VazquezGuitierrez F. & Rullkötter J. (2008). Sources of hydrocarbon pollution in surface sediments of the Campeche Sound, Gulf of Mexico, revealed by biomarker analysis. *Organic Geochemistry*. Vol. 39: 1104 - 108.
- Schrope M. (2010). The lost legacy of the last great oil spill. *Nature*. Vol. 466: 304 – 305..
- Serrano F., Torrado M. & Pérez D. (2013). Impacto de los derrames de crudo en las propiedades mecánicas de suelos arenosos. *Ciencia y Tecnología*. Vol. 11: 233 – 244.
- Shan L. (2002). Mechanisms of granular activated carbon anaerobic fluidized-bed process for treating phenols wastewater. *Journal of Environment Science*. Vol. 14: 132 – 135.
- Shin C. & Das M. (2001). Bearing Capacity of Unsaturated Oil – Contaminated Sand. *International Journal Offshore Polar Engineering*. Vol. 11: 220 – 227.
- Shubotz F., Lipp J., Elvert M., Kasten S., Mollar X., Zabel M. *et al.* (2011). Petroleum degradation and associated microbial signatures at the chapopote asphalt volcano, Southern of Mexico. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. Vol. 75: 4377 – 4398
- Smith R. (1994). The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria In: *Biochemistry and Microbial Degradation*, (Ed.) C. Ratledge. Klawer Academic Publishers, The Netherlands. p. 347 – 378.
- Solanas M. (2009). La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. Departamento de Microbiología. p. 1 – 8.
- Song B. & Ward B. (2005). Genetic Diversity of Benzoyl Coenzyme A Reductase Genes Detected in Denitrifying Isolates and Estuarine Sediment Communities. *Appli. Environ. Microbiol.* Vol. 68: 1516 – 1523.
- Soto G., Cárdenas C., Araujo I., Méndez E., Isea D. (2016). Biorremediación “*in vitro*” de un suelo contaminado con hidrocarburo utilizando bacterias autóctonas. Página web: [www.bvsde.paho.org/bvsaidis/impactos/peru/venmam010.pdf](http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/impactos/peru/venmam010.pdf).
- Spier C., Stringfellow T., Hazen T. & Conrad M. (2013). Distribution of hydrocarbons released during the 2010 MC252 oil spill in deep offshore waters. *Environmental*

- pollution. Vol. 173: 224 – 230.
- Stanchi O., Martino E., Gentilini E., Reinoso H., Echeverría G. & Leardini N. (2007). *Microbiología Veterinaria*. Editorial Intermedica. Argentina.
- Sylvia D., Fuhrmann J., Hartel P. & Zuberer D. (2005). Principles and applications of soil microbiology. Printice Hall. New Jersey. USA. Vol. 53: 218 – 256.
- Tropel D. & van der Meer J. (2004). Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Vol. 68 (3): 474 – 500.
- Tsao W., Song H. & Bartha R. (1998). Metabolism of benzene, toluene and xylene hydrocarbons in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 64 (12): 4924 – 4929.
- Van der Meer R., de Vos W., Harayama S. & Zehnder A. (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds.
- Van Hamme J., Singh A. & Ward O. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Vol. 67: 503 – 549.
- Vasudevan N. & Rajaram P. (2001). Bioremediation of soil sludge-contaminated soil. *Environment International.* Vol. 26: 409 – 411.
- Weiner M. & Lovley D. (1998). Rapid benzene degradation in methanogenic sediments from a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 64: 1937 – 1939.
- Witzig R., Junca H., Hecht H. & Pieper D. (2006). Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: Links between benzene biodegradation and genes similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 72 (5): 3504 – 3514.
- Yakimov M., Timmis K. & Golyshin P. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology.* Vol. 18: 257 – 266
- Yerushalmi L., Rocheleau S., Cimpoia R., Sarrazin M., Sunahara G., Peisajovich A., Leclair G. & Guiot S. (2003). Enhanced Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in contaminated soil. *Bioremediation J.* Vol. 7 (1): 37 – 51.
- Yu W., Dodds W., Banks M. & Skalsky J. (1995). Optimal staining and sample storage time for direct microscopic enumeration of total and active bacteria in soil with two fluorescent dyes. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 61 (9): 3367 – 3372.
- Yu Y., Liu Y. & Wu L. (2013). Sorption and degradation of pharmaceuticals and personal care products (PPcPs) in soils. *Environmental Science Pollution Restoration.* Vol. 20: 4261 – 4267.

## ANEXOS





UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO

FACULTADA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA

LABORATORIO DE ECOLOGÍA ACUÁTICA



## Constancia

EL QUE SUSCRIBE RESPONSABLE DE LABORATORIO DE ECOLOGÍA ACUÁTICA  
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNA PUNO

### HACE CONSTAR

Que el Bachiller **JUAN SILAS CCANCCE AYAMAMANI** egresado de la escuela profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano, ha realizado el trabajo de Investigación: **“DETERMINACIÓN DE BACTERIAS HETERÓTROFAS EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS Y SU CAPACIDAD DE TOLERAR CONCENTRACIONES CRECIENTES DE PETRÓLEO in vitro”**, Realizado en los meses de Julio – Octubre del 2017 en este laboratorio.

Se emite la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime por conveniente.

  
Balbino Lorgio Palacios Frisancho  
BIOLOGO  
D.B.P. Nº 2125