



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Evaluación del efecto emulsificante del ramnolípido
producido por la cepa *Pseudomonas aeruginosa* 6k-11
en la biorremediación de suelo contaminado con
petróleo crudo a nivel de laboratorio**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para optar el Grado Académico de Bachiller en Microbiología y
Parasitología

AUTOR

Diego Yamir OCÁN TORRES

ASESOR

Mg. Fernando MERINO RAFAEL

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Ocán, D. (2023). *Evaluación del efecto emulsificante del ramnolípido producido por la cepa Pseudomonas aeruginosa 6k-11 en la biorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo a nivel de laboratorio*. [Trabajo de investigación de bachiller, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Diego Yamir Ocán Torres
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70302777
URL de ORCID	No aplica
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Fernando Abilio Merino Rafael
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08088358
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6975-8261
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Carmen Rosa Mendez Farro
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08800393
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Bernabé Salomón Luis Alaya
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	45503882
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Mario Alcarraz Curi
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	31159746
Datos de investigación	

Línea de investigación	A.1.2.1. Biorremediación y Bioconversión
Grupo de investigación	Biología para la remediación - BIOREM
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Trabajos de Investigación para obtención de grado Académico de bachiller. PTI N°B20100580a
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Nacional Mayor de San Marcos) Laboratorio S-23 País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Manzana y lote: (según corresponda) Calle: (según corresponda) Latitud: -12.059689388919 Longitud: -77.08211374385
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Diciembre 2020 – diciembre 2021
URL de disciplinas OCDE	Biorremediación, Biotecnologías de diagnóstico en la gestión ambiental https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.08.02 Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN)**

Siendo a las 10:13 horas del 20 de marzo del 2023, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/sko-tznu-odf>, y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Grado Académico de Bachiller en Microbiología y Parasitología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** de **DIEGO YAMIR OCÁN TORRES**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20230014082, el graduando expuso su Trabajo de Investigación **EVALUACIÓN DEL EFECTO EMULSIFICANTE DEL RAMNOLÍPIDO PRODUCIDO POR LA CEPA *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO CRUDO A NIVEL DE LABORATORIO**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **19** calificado: Aprobado con máximos honores.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Grado Académico de Bachiller en Microbiología y Parasitología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** de **DIEGO YAMIR OCÁN TORRES** y se eleva lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título conforme a ley.

Siendo las 11:50 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 20 de marzo de 2023.

Mg. CARMEN MENDEZ FARRO
(PRESIDENTA)

Mg. MARIO ALCARRAZ CURÍ
(MIEMBRO)



UNMSM

Firmado digitalmente por MERINO
RAFAEL Fernando Abilio FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 27.03.2023 10:10:18 -05:00

Mg. FERNANDO MERINO RAFAEL
(ASESOR)

Mg. BERNABE LUIS ALAYA
(MIEMBRO)



INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

DIRECTOR E.P DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA	: Ph.D. Pedro Luis Castellanos Sánchez
OPERADOR DEL PROGRAMA INFORMÁTICO DE SIMILITUDES	: Dra. Liz Erika Cruz Pio
DOCUMENTO EVALUADO *	: "Evaluación del efecto emulsificante del ramnolípido producido por la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K-11 en la biorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo a nivel de laboratorio "
AUTOR (A) DEL DOCUMENTO **	: Est. DIEGO YAMIR OCÁN TORRES
FECHA DE RECEPCIÓN	: 20/02/23
FECHA APLICACIÓN DEL SISTEMA INFORMÁTICO	: 20/02/23
SOFTWARE UTILIZADO	: TURNITIN (X) ITHENTICATE () OTRO (especificar)
CONFIGURACIÓN DEL PROGRAMA DETECTOR DE SIMILITUDES	: Excluye textos encomillados (x) : Excluye bibliografía (x) : Excluye cadenas menores a 40 palabras (x) : Otro criterio (especificar)
PORCENTAJE DE SIMILITUDES ***	: Siete por ciento (7%)
FUENTES ORIGINALES DE LAS SIMILITUDES ENCONTRADAS	: www.hdl.handle.net (5%) www.tdx.cat (1%) patents.google.com (<1%) 1library.co (<1%) es.scribd.com (<1%) doczz.es (<1%)
OBSERVACIONES:	
CALIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD	- Documento cumple criterio de originalidad sin observaciones (X) - Documento cumple criterio de originalidad con observaciones () - Documento no cumple criterios de originalidad ()

Ciudad universitaria, 21 de febrero del 2022

Dra. Liz Erika Cruz Pio
Evaluador



Firmado digitalmente por
CASTELLANOS SANCHEZ Pedro
Luis FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 21.02.2023 15:49:48 -05:00

Ph.D. Pedro Luis Castellanos Sánchez
Director EPMP

A mi madre, a quien todo se lo debo.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres, Eusebia y Jesús, quienes, a pesar de las adversidades, siempre tuvieron la disposición de apoyarme y darme el soporte humano que tanto necesité y que, sin duda alguna, ni la eternidad será suficiente para retribuir todo lo que dieron e hicieron por mí.

A mi hermano Jesús, quien fue y será siempre mi mayor referente; aquel que cuidó de mí en los peores momentos y que a pesar de ello, me enseñó a sonreírle siempre a la vida. Gracias por tanto cariño hermano.

A mis profesores, Dra. Susana Gutiérrez y Mg. Fernando Merino, por ser fuentes de inspiración constante y a quienes debo gran parte de mi aspiración por ser, no solo un buen microbiólogo, sino una mejor persona. Agradezco infinitamente aquella oportunidad que me brindaron al abrirme las puertas de su laboratorio, ya que sin ello no habría desarrollado mi gran interés por la ciencia. Los consejos constantes y su apoyo invaluable fueron parte esencial para el desarrollo de este trabajo de investigación. Así como también, las charlas amenas y los buenos momentos.

A mis amigos y futuros colegas, Valeria Goycochea, José Luis Pasco, Fabrizio Vásquez y Tatiana Ancajima, con quienes compartí bonitos momentos durante el pregrado.

A Lucia Ramos y mi novia Ana Paula Palacios, a quienes aprecio y guardo un enorme cariño casi fraternal. Nunca olvidaré lo difícil que fue recorrer esta etapa y que, a pesar de la adversidad que imponía la época de pandemia, supimos sacar adelante el trabajo de investigación. Siempre estaré orgulloso y feliz por todo lo que están logrando. Mi más grande admiración para ustedes.

A mis compañeros de LAMYBIM, Ingrid Alarcón, Kevin Pizarro, Jorge Llerena, Miguel Alcalde, María Gracia Alvan, Andrea Ayala, Mariel Vega, Marilyn Veliz y Lucia Ramos, con quienes compartí y aprendí innumerables cosas dentro del laboratorio. Agradezco su paciencia infinita y su buen ánimo día a día. Estoy seguro de que todo el esfuerzo les será retribuido.

A mis amigos, Leo, Simone, Alex y Jasper, con quienes conviví por cinco meses durante mi estadía en Barcelona. Recordaré siempre cada momento en lo que fue, la más grande aventura que he tenido hasta ahora.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por el financiamiento al presente trabajo en el programa "Promoción de trabajo de investigación para optar el grado de Bachiller".

Finalmente, sabiendo que no podrás leer esto ni verme el día de mi graduación como tanto lo soñaste, gracias por creer siempre en mí, por darme cariño y sentirte orgulloso de lo que siempre hacía. Donde quiera que te encuentres, quiero decirte que he cumplido mi sueño, querido abuelo.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	OBJETIVOS.....	4
1.1.1	Objetivo principal	4
1.1.2	Objetivos secundarios	4
2	MATERIAL Y MÉTODOS	4
2.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	4
2.2	REACTIVOS E INSUMOS QUÍMICOS.....	5
2.3	MATERIAL DE LABORATORIO	5
2.4	MÉTODOS.....	5
2.4.1	Muestreo y pretratamiento del suelo	5
2.4.2	Esterilización y caracterización de las muestras de suelo	5
2.4.3	Determinación de la actividad hidrocarbonoclástica de cepas bacterianas no productoras de ramnolípido	6
2.4.4	Determinación cualitativa de la actividad antagonista	6
2.4.5	Evaluación de la toxicidad del ramnolípido	7
2.4.6	Preparación del inóculo microbiano	7
2.4.7	Preparación de los sistemas para los ensayos de biorremediación	7
2.4.8	Evaluación del tratamiento de biorremediación	8
2.4.9	Análisis estadístico	11
3	RESULTADOS.....	11
3.1	ESTERILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL SUELO	11
3.2	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROCARBONOCLÁSTICA.....	12
3.3	PRUEBAS DE ANTAGONISMO Y SELECCIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO PARA EL TRATAMIENTO DE BIORREMEDIACIÓN.....	14
3.4	TOXICIDAD DEL RAMNOLÍPIDO	16
3.5	ENSAYOS DE BIORREMEDIACIÓN	19
3.5.1	Parámetros fisicoquímicos	19
3.5.2	Recuento de bacterias aerobias mesófilas	22
3.5.3	Cuantificación de ramnolípidos	22
3.5.4	Cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo	23
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
4	DISCUSIÓN	26
4.1	ESTERILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL SUELO	26
4.2	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROCARBONOCLÁSTICA.....	26
4.3	PRUEBAS DE ANTAGONISMO Y SELECCIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO.....	27
4.4	TOXICIDAD E INFLUENCIA DEL RAMNOLÍPIDO.....	27
4.5	ENSAYO DE BIORREMEDIACIÓN.....	29
5	CONCLUSIONES.....	32

6	ANEXOS	33
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1	Ensayos de biorremediación de hidrocarburos a nivel de microcosmos.....	8
Tabla N° 2	Recuento de bacterias totales en UFC/g de suelo para suelo irradiado y no irradiado	11
Tabla N° 3	Resultados de los macronutrientes de la muestra de suelo.....	11
Tabla N° 4	Resultados de las condiciones de la habitabilidad de la muestra de suelo	12
Tabla N° 5	Resultados de las condiciones de la caracterización del suelo.....	12
Tabla N° 6	Medidas de absorbancia y variación porcentual para cada cepa evaluada durante 7 días de incubación.....	12
Tabla N° 7	Medidas de absorbancia y variación porcentual para cada cepa evaluada durante 7 días de incubación.....	13
Tabla N° 8	Interpretación cualitativa de la prueba cuantitativa de la prueba de antagonismo	14
Tabla N° 9	Concentración de HTP para cada tratamiento al cabo de 15 días.....	24
Tabla N° 10	Reducción y porcentaje de reducción real de HTP para cada tratamiento al cabo de 15 días.....	25
Tabla N° 11	Test de comparación múltiple de Dunnett reducción de los HTP	25

LISTA DE FIGURAS

- Figura N°1** Pruebas de antagonismo por el método de la bicapa de las cinco cepas con capacidad hidrocarbonoclástica. A) Actividad antagonista con la cepa testigo IT4B-3. B) Actividad antagonista con la cepa testigo 2K-1. C) Actividad antagonista con la cepa testigo 22b. D) Actividad antagonista con la cepa testigo 3K-6. E) Actividad antagonista con la cepa testigo IIBA4-5(25).15
- Figura N°2** Ensayos de toxicidad del ramnolípido empleando la cepa *P. aeruginosa* IT4B-3. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.16
- Figura N°3** Ensayos de toxicidad del ramnolípido empleando la cepa *P. aeruginosa* 2K-1. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.17
- Figura N°4** Ensayos de toxicidad del ramnolípido empleando la cepa *B. cepacia* 22b. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.18
- Figura N°5** Ensayos de toxicidad del ramnolípido empleando la cepa *P. aeruginosa* 3K-6. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.19
- Figura N°6** Porcentaje de humedad tomados al inicio y al final del tratamiento de biorremediación durante 15 días. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.20
- Figura N°7** Medición del pH tomados al inicio y final del tratamiento de biorremediación durante 15 días. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.21
- Figura N°8** Medición de la temperatura tomados al inicio y final del tratamiento de biorremediación durante 15 días. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.21
- Figura N°9** Recuento de bacterias aerobias mesófilas a los 0 y 15 días en los diferentes tratamientos de biorremediación. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.22
- Figura N°10** Concentración de ramnolípidos a los 0 y 15 días en los diferentes tratamientos de biorremediación. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.23
- Figura N°11** Concentración de HTP a los 0 y 15 días en los diferentes tratamientos de biorremediación. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.24

LISTA DE ANEXOS

Tabla A1	Valores del porcentaje de humedad tomados al inicio y al final del tratamiento de biorremediación durante 15 días	33
Tabla A2	Valores del pH tomados al inicio y final del tratamiento de biorremediación durante 15 días	33
Tabla A3	Valores de temperatura tomados al inicio y final del tratamiento de biorremediación durante 15 días	33
Tabla A4	Valores del recuento de bacterias aerobias mesófilas tomados al inicio y final del tratamiento de biorremediación durante 15 días	33
Tabla A5	Valores de la concentración de ramnolípidos tomados al inicio y final del tratamiento de biorremediación durante 15 días.....	34
Tabla A6	Crecimiento microbiano a concentraciones distintas de RI a los 0 días	34
Tabla A7	Crecimiento microbiano a concentraciones distintas de RI a los 7 días	34
Tabla A8	Crecimiento microbiano a concentraciones distintas de RI a los 14 días	35
Tabla A9	Prueba de ANOVA de una sola vía de la reducción de los HTP a los 15 días de tratamiento	35
Figura A1	Curva de calibración de Biomasa en g/L vs Absorbancia a 620 nm para la cepa <i>P. aeruginosa</i> 2K-1 codificada como HSM-HC11	36
Figura A2	Curva de calibración de Biomasa en g/L vs Absorbancia a 620 nm para la cepa <i>P. aeruginosa</i> 3K-6 codificada como HSM-HC5	36
Figura A3	Curva de calibración de Biomasa en g/L vs Absorbancia a 620 nm para la cepa <i>P. aeruginosa</i> IT4B-3 codificada como HSM-HC7	37
Figura A4	Curva de calibración de Biomasa en g/L vs Absorbancia a 620 nm para la cepa <i>B. cepacia</i> IT4B-3 codificada como HSM-HC13	37
Figura A5	Grafica de reducción de HTP en 500 g de suelo a los 15 días de tratamiento con significancia y errores obtenida del análisis de ANOVA.....	38
Figura A6	Grafica QQ plot obtenida del análisis de ANOVA.....	38
Figura A7	Morfología celular mediante tinción de gram de las bacterias conformadoras del consorcio con actividad hidrocarbonoclástica. A) <i>P. aeruginosa</i> 2K-1; B) <i>P. aeruginosa</i> 3K-6; C) <i>P. aeruginosa</i> IT4B-3; D) <i>B. cepacia</i> 22b	39

Resumen

La contaminación por hidrocarburos de petróleo es un problema que afecta gravemente diversos ecosistemas debido a su baja biodegradabilidad. Ante ello, se buscan diferentes alternativas de solución eco amigables, como el empleo de metabolitos surfactantes producidos por microorganismos. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la eficiencia del efecto emulsificante del ramnolípido producido por la cepa nativa *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11, en un proceso de biorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo, a nivel de laboratorio. Se emplearon cuatro sistemas con suelo y petróleo crudo. Al ensayo de prueba se le adicionó 8 g/L de ramnolípido, mientras que al control positivo se agregó Tween 80 como surfactante comercial. Los tratamientos se evaluaron a los 0 y 15 días después de haber sido incubados a condiciones ambientales. El tratamiento con Tween 80 manifestó una reducción final de 9.146 g (40.648%) de hidrocarburos totales de petróleo (HTP)/500 g suelo, siendo el de mayor rendimiento, seguido por el ensayo con ramnolípidos, el cual redujo 8.655 g HTP/500 g suelo (34.620%), sin embargo, ambos resultados no son diferentemente significativos. Se concluyó que la adición del ramnolípido acelera y mejora el proceso de degradación de HTP en el proceso de remediación biológica del suelo.

Palabras clave: Hidrocarburos totales de petróleo, biosurfactante, ramnolípido, biorremediación, toxicidad.

Abstract

Contamination by petroleum hydrocarbons is a problem that seriously affects diverse ecosystems due to its low biodegradability. Therefore, different eco-friendly alternative solutions are being sought, such as the use of surfactant metabolites produced by microorganisms. The objective of this study was to evaluate the efficiency of the emulsifying effect of rhamnolipid produced by the native strain *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11, in a bioremediation process of soil contaminated with crude oil, at laboratory level. Four systems with soil and crude oil were used. To the test assay, 8 g/L of rhamnolipid was added, while to the positive control, Tween 80 was added as a commercial surfactant. Treatments were evaluated at 0 and 15 days after incubation at ambient conditions. The Tween 80 treatment showed a final reduction of 9.146 g (40.648%) of total petroleum hydrocarbons (TPH)/500 g soil, being the one with the highest performance, followed by the rhamnolipid trial, which reduced 8.655 g TPH/500 g soil (34.620%), however, both results are not differentially significant. It was concluded that the addition of rhamnolipid accelerates and improves the TPH degradation process in the biological soil remediation process.

Keywords: Total petroleum hydrocarbons, biosurfactant, rhamnolipid, bioremediation, toxicity.

1 INTRODUCCIÓN

La contaminación por derrames de petróleo se ha convertido en la actualidad en un problema global, debido a que tiene efectos que persisten en los diversos ecosistemas a causa de la alta toxicidad de sus compuestos. (Wei et al., 2020). Debido a esta razón, son denominados compuestos recalcitrantes, clasificados como contaminantes primarios (Costa et al., 2012). Dado a sus características físicas y químicas, los compuestos derivados del petróleo aumentan las demandas biológicas y químicas de oxígeno, tanto en el suelo como en ambientes acuosos (Singh & Rathore, 2019), dificultando de este modo, la correcta asimilación de macro y micronutrientes para las diferentes formas de vida y alterando sus actividades, estructura y diversidad (Helmy et al., 2015). A pesar de esto, algunos tipos de microorganismos son capaces de degradar naturalmente los compuestos hidrocarbonados; proceso que se ve limitado ante la baja bioaccesibilidad y complejidad de los hidrocarburos del petróleo (Eras et al., 2022).

Ante esto, se han venido estudiando diferentes técnicas para mitigar y remediar el daño generado a causa de este tipo de contaminantes, tales como procesos químicos, los cuales involucran el uso de agentes quelantes y tensioactivos químicos (Zang et al., 2021); procesos físicos, mediante el uso de materiales adsorbentes como el carbón activado (Silvani et al., 2017); y procesos biológicos, empleando microorganismos o metabolitos producidos por estos mismos, los cuales son enmarcados dentro del concepto de biorremediación (Ahmad et al., 2016). La biorremediación de suelos contaminados con petróleo ha sido planteada, en los últimos años, cómo una alternativa de descontaminación rentable, no convencional y sostenible (Trejos-Delgado et al., 2020).

Entre las técnicas de biorremediación más estudiadas, tenemos a la bioestimulación y la bioaumentación. La primera, consiste en la adición de nutrientes o receptores de electrones para aumentar la actividad metabólica del microbiota autóctono, por otro lado, en la bioaumentación, se introducen microorganismos nativos previamente aislados e incrementados en biomasa, para acelerar el proceso de degradación (Chen et al., 2015). Los residuos de hidrocarburos de petróleo también pueden ser tratados empleando diferentes productos como surfactantes y solventes, ya sean de origen biológico o químico (Kanaly & Harayama, 2010). Sin embargo, el uso de estas últimas, por lo general, presentan una biodegradabilidad nula o baja resultando tóxicos para los ecosistemas (Farias et al., 2021; Henkel et al., 2012).

A la fecha, se ha venido investigando diferentes productos que funcionen como sustitutos naturales y a su vez, mejoren su rendimiento, tal es el caso, de los denominados

biosurfactantes o compuestos tensioactivos microbianos (Eras et al., 2022). Un ejemplo de ello, son los ramnolípidos, los cuales presentan una alta capacidad de biodegradabilidad en condiciones aerobias y anaerobias los que los hace candidatos potenciales para ser empleados en procesos de biorremediación (Zhong et al., 2014). Los ramnolípidos son moléculas anfipáticas compuestas de una región polar (hidrofílica) y una no polar (hidrofóbicas) la cual puede acumularse en la interfaz de materiales polares y no polares como la interfaz entre la fase acuosa y el suelo (Pletnev, 2001). Las “colas” no polares en las micelas formadas por estos biotensioactivos pueden interactuar con los hidrocarburos en suelos contaminados e incrementar su solubilidad, aumentando así la biodisponibilidad a los microorganismos del suelo (Gao et al., 2007).

Koch et al. (1991), demostraron que los ramnolípidos juegan un papel importante en la absorción y utilización del hexadecano por cepas mutantes de *Pseudomonas aeruginosa*, ya que estas carecían la capacidad de degradar el hexadecano de un medio de cultivo. Cuando se añadieron pequeñas cantidades de ramnolípidos purificados a los cultivos, dichas cepa pudieron reestablecer su metabolismo para la degradación de dichos compuestos.

Rocha & Infante (1997), probaron la biodegradación de un lodo aceitoso utilizando un biotensioactivo producido por *Pseudomonas aeruginosa* USB-CS1. Los resultados obtenidos reflejan una degradación del sustrato aceitoso significativamente mayor después de 30 días de incubación, cuando se suministró al tratamiento el biosurfactante, obteniendo una media de degradación del 70%. Además, se demostró que los compuestos saturados y aromáticos son más susceptibles a la degradación microbiana, hecho por el cual, se sugirió desarrollar nuevas metodologías para emplear los biosurfactantes en procesos de biorremediación ya que, estos podrían perder la actividad superficial.

Youssef et al. (2007) y Nguyen et al. (2008), emplearon mezclas de biosurfactantes para generar tensiones interfaciales más bajas, lo cual mejoraría la disponibilidad de hidrocarburo en un tratamiento de biorremediación. De esta manera se empezó a diversificar las diferentes estrategias en el uso de biosurfactantes y así mejorar la optimización de dicho proceso.

Chaprão et al. (2015), investigó la aplicación potencial de surfactantes de origen biológico para mejorar la capacidad de eliminación y biodegradación de arena contaminada con aceite de motor en condiciones de laboratorio. Se comprobó la eficiencia de los surfactantes obteniendo una remoción de aceite del 70% al 90% superando los valores obtenidos cuando se ensayó con surfactantes sintéticos; los cuales removieron del 55% al 80%. Así mismo, los valores máximos de remoción se obtuvieron cuando se agregó un inóculo microbiano y suplementado con melaza de caña de azúcar.

Mnif et al. (2017), estudió la degradación de gasóleo en suelo empleando cuatro tipos de bacterias con propiedades hidrocarbonoclasticas, así mismo, demostró que la adición de un surfactante de tipo lipopéptido producido por *Bacillus subtilis* SPB1, aumenta la movilidad del diesel y su remoción en un 12.19% con respecto a un proceso bioaumentado; y en un 32.67% cuando se emplea un consorcio microbiano y dos cepas bacterianas con capacidad productora de surfactantes. De esta forma, se evidencia una mejora en los procesos de remoción de hidrocarburos, empleando técnicas combinadas.

Lee et al. (2018), evaluó la producción de surfactantes a partir de bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos derivados del petróleo, durante un proceso de degradación de petróleo crudo. Los ensayos obtenidos manifestaban valores bajos de tensión superficial ($33.9 - 41.3 \text{ mN m}^{-1}$) e índices de emulsificación hasta de 65%, lo que manifiesta la degradación activa del hidrocarburo. Así mismo, determinaron que los principales surfactantes producidos fueron los monoramnolípidos y diramnolípidos.

Sun et al. (2019), diseñó un proceso para el tratamiento de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) de sustratos lodosos, empleando bacterias de la especie *Pseudomonas aeruginosa* S5 con capacidad productora de surfactantes, las cuales fueron aisladas de aguas residuales. Los ensayos realizados manifestaron una degradación de HAP con una reducción de una concentración inicial de $9141.02 \mu\text{g/L}$ a una final de $5117.16 \mu\text{g/L}$. en 15 días de tratamiento; lo cual demostró una mejora en el tratamiento ante la presencia de microorganismos autóctonos con capacidad de producir surfactantes.

Wei et al. (2020), llevó a cabo un estudio a nivel de microcosmos para investigar el impacto de la aplicación integrada de carbón activado, ramnolípidos y nitrógeno en la remediación de hidrocarburos de petróleo sobre suelos de pantano; logrando una reducción máxima del 80.9% cuando se combinaron los tres componentes. De manera complementaria se observó que, a lo largo del tratamiento, la comunidad bacteriana típica cambió a una mayor abundancia de Proteobacterias y Bacteroidetes.

Bao et al. (2022), investigó los efectos sobre la sucesión de la comunidad microbiana mediante la adición de hidrocarburos de petróleo y ramnolípidos durante el compostaje de desechos orgánicos; en el cual, demostraron que la adición de los ramnolípidos reduce los niveles de hidrocarburos en un 73.52 % frente a un 53,81 % del tratamiento sin adición.

Actualmente, en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana, se ha logrado conseguir una mejora en la optimización de la producción de un biosurfactante de naturaleza ramnolípida (Alcalde, 2018); sin embargo, no se conoce con exactitud la eficiencia emulsificante de dicho metabolito en tratamientos de suelos contaminados con

hidrocarburos de petróleo; razón por la cual, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal evaluar la eficiencia del efecto emulsificante del ramnolípido en un proceso de biorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo principal

Evaluar la eficiencia del efecto emulsificante del ramnolípido producido por la cepa nativa *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11, en un proceso de biorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo, a nivel de laboratorio.

1.1.2 Objetivos secundarios

Evaluar el nivel de toxicidad del ramnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 frente a otros microorganismos.

Diseñar un consorcio microbiano con capacidad hidrocarbonoclástica no productoras de ramnolípidos.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepas bacterianas no productoras de ramnolípidos aisladas de ambientes contaminados con petróleo crudo de las refinerías de Talara y La Pampilla, identificadas como:
 - *Pseudomonas aeruginosa* M1AA25B, *Pseudomonas aeruginosa* L1TA1, *Pseudomonas aeruginosa* 1B1 (49), *Pseudomonas aeruginosa* 3K-6, *Pseudomonas aeruginosa* IT4B-3, *Pseudomonas aeruginosa* 4BH-2, *Pseudomonas aeruginosa* 19, *Pseudomonas aeruginosa* 2K-1, *Pseudomonas aeruginosa* IA3K2(B).
 - *Aeromonas hydrophila* 2K-3.
 - *Chryseobacterium indologenes* IA1-B-5.
 - *Burkholderia cepacia* 4B14, *Burkholderia cepacia* IIBA2-4, *Burkholderia cepacia* 22b, *Burkholderia cepacia* IIBA4-5(25).
- Biosurfactante de naturaleza ramnolípídica producido por la cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11.
- Suelo de cultivo de hortalizas procedente de zonas aledañas a la huaca de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

2.2 REACTIVOS E INSUMOS QUÍMICOS

Petróleo crudo recolectado de la refinería La Pampilla, surfactante comercial Tween-8, medio de cultivo TSB, medio de cultivo TSA, medio de cultivo APC, medio de cultivo MSM, Éter dietílico ((C₂H₅)₂O), Ácido sulfúrico (H₂SO₄), Sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), Cloruro de sodio (NaCl), Nitrato de amonio (NH₄NO₃), Fosfato monopotásico (KH₂PO₄), Diclorometano (CH₂Cl₂), Nitrato de potasio (KNO₃), Tris-HCl, Azida de sodio (NaN₃), Reactivo resorcinol (C₆H₆O₂).

2.3 MATERIAL DE LABORATORIO

Frascos de vidrio de 1L de boca ancha, baguetas, espátulas de acero, balanza. autoclave, centrífuga, incubadora con agitación, fiola, baño maría, placas Petri, espectrofotómetro, tubos de ensayo pírex, potenciómetro, estufa, tamiz de malla 2 mm, mortero y pilón.

2.4 MÉTODOS

2.4.1 Muestreo y pretratamiento del suelo

Se recolectó 5 kg de muestra de suelo de cultivo proveniente de los alrededores a la “Huaca San Marcos”, perteneciente la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) ubicada en el distrito de Cercado de Lima, Lima, Perú. Las muestras se tomaron en cinco puntos distintos de la zona en un rango de profundidad entre 0.25 m y 1 m, luego se homogenizó de manera manual y se colocó en un recipiente de polipropileno manteniendo una cadena de frío de 4°C hasta su traslado al laboratorio de Microbiología y Biotecnología microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

La totalidad de la muestra se secó a temperatura ambiente por un periodo de 4 días; posteriormente, con ayuda de un mortero, se homogenizó y se pasó por un tamiz de malla de 2 mm con el fin de que el hidrocarburo se distribuya uniformemente al momento de la experimentación y evitar así la formación de agregados en el suelo (Arrieta et al., 2012). La muestra se almacenó en botellas estériles de vidrio color ámbar para su posterior análisis y caracterización.

2.4.2 Esterilización y caracterización de las muestras de suelo

La totalidad de la muestra de suelo se esterilizó por irradiación gamma la cual se realizó en la planta de irradiación multiusos del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN).

Posterior a esto, se tomó una muestra significativa de 1 kg (Cline, 1944) para determinar las características físicas y químicas del suelo tales como: textura, salinidad, materia orgánica,

Carbono, Nitrógeno, Fósforo, Potasio y pH. La muestra se analizó en el laboratorio de ensayo e investigación SISTEMA DE SERVICIOS Y ANÁLISIS QUÍMICOS S.A.C. – SLAB ubicada en la Urbanización Vipol de Naranjal en el distrito de San Martín de Porres, Lima, Perú.

2.4.3 Determinación de la actividad hidrocarbonoclástica de cepas bacterianas no productoras de ramnolípido

Para la determinación de la actividad hidrocarbonoclástica de cepas bacterianas, se empleó una modificación de la metodología descrita por (X. Zhang et al., 2012). Se seleccionaron 15 cepas bacterianas del banco de cepas del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana previamente identificadas (Palomino, 2018) las cuales tenían como característica la no producción de ramnolípidos (Tabuchi, 2014). La totalidad de las cepas fueron reactivadas en 3 mL de caldo tripticasa de soya (TSB) y se incubaron a 37°C y 180 rpm de agitación durante 18 horas. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 14 500 rpm durante 10 minutos con la finalidad de recuperar el pellet microbiano precipitado, el cual se empleó como inóculo al 5% del volumen final (p/v) para un cultivo escalado de 50 mL de medio mineral Bushnell Haas (BS) más petróleo crudo al 1% como única fuente de carbono. Se utilizó como control negativo un cultivo con medio BS y petróleo crudo con 2.5 ml de agua destilada estéril como inóculo. Todos los ensayos fueron incubados a 30°C y 180 rpm de agitación durante 7 días.

Se midió el crecimiento microbiano tomando en cuenta la turbidez mediante la lectura de la absorbancia a 620 nm de longitud de onda por medio de un espectrofotómetro UV-VIS GENESYS 150. Las tomas de muestra se realizaron por triplicado al inicio y fin de la experimentación.

2.4.4 Determinación cualitativa de la actividad antagonista

El ensayo para determinar la actividad antagonista entre las cinco cepas seleccionadas para la conformación del consorcio microbiano con la mejor actividad hidrocarbonoclástica, se realizó empleando el método de la bicapa descrita por (Dopazo et al., 1988). Cada cepa fue sembrada por moteado sobre la superficie de una placa con agar tripticasa de soya (TSA) tomando en cuenta de no sembrar la cepa a enfrentar en cada caso. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas; al cabo de ese tiempo se expusieron a vapores de cloroformo durante 1 hora.

Posteriormente, se inocularon 500 μ L de un cultivo ajustado a 0.5 McFarland, correspondientes a las cepas a enfrentar, en un tubo de ensayo con 5 mL de TSA

semisólido; se homogenizó el contenido en un agitador vórtex y se vertió sobre cada placa previamente procesada con las cepas antagonistas hasta formar una bicapa. Finalmente, todas las placas se incubaron a 37°C por 18-24 horas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado

2.4.5 Evaluación de la toxicidad del ramnolípido

Para evaluar los posibles efectos tóxicos del ramnolípido sobre la actividad microbiana, se empleó la metodología descrita por Wolf & Gan (2018). Se prepararon medios de cultivos empleando como única fuente de carbono, dos soluciones de ramnolípidos equivalentes a 0.1X CMC (0.8 g/L) y 10X CMC (80 g/L) en un medio mineral Bushnell Haas; los cuales fueron posteriormente inoculados con las cepas conformadoras del consorcio hidrocarbonoclástico. Para esto, cada una de las cepas seleccionadas previamente en el ensayo de antagonismo, se escalaron al 10% (v/v) hasta alcanzar un cultivo final de 50 mL. Se incluyó un control positivo usando glucosa (2.5 g/L) como fuente de carbono y un control negativo sin fuente de carbonada. Todos los cultivos se incubaron a 30°C y 100 rpm de agitación durante 14 días. La totalidad de los ensayos se realizaron por duplicado y se evaluaron tomando muestras de 1 mL para la lectura de la biomasa microbiana a 620 nm de longitud de onda a los 0, 7 y 14 días.

2.4.6 Preparación del inóculo microbiano

Una vez seleccionado el consorcio microbiano con actividad hidrocarbonoclástica, se procedió a reactivar las cepas en 5 mL de caldo TSB y se escaló al 10% (v/v) de un volumen final de 50 mL incubado a 30°C y 100 rpm de agitación durante 24 horas. Posterior a esto, cada cultivo se centrifugó a 14 500 rpm durante 10 minutos, recuperando únicamente el pellet microbiano y resuspendiendo la misma en solución salina (NaCl 0.85%) de manera que el volumen final en conjunto del inóculo microbiano fue igual al 10% del volumen del terrario (Bocángel, 2016). La cantidad de biomasa inoculada se determinó previamente mediante la lectura en el espectrofotómetro a 620 nm de longitud de onda.

2.4.7 Preparación de los sistemas para los ensayos de biorremediación

Se prepararon 4 tratamientos, los cuales estaban conformados por 1 microcosmos (Prueba) y 3 controles (Control positivo, Control negativo y Control abiótico). Se emplearon frascos de vidrio de borosilicato estériles de 1L de capacidad, conteniendo cada uno 500 g de suelo y petróleo crudo estéril (5% p/p). Se probó una concentración de ramnolípido equivalente a 1x CMC (8 g/L) para cada tratamiento con excepción del control negativo.

La contaminación artificial del suelo con hidrocarburos de petróleo se realizó empleando una técnica modificada descrita por (Brinch et al., 2002) en la cual, para cada tratamiento, se pesó 100 g de muestra de suelo estéril y se adicionó 25g de petróleo crudo estéril. Se utilizó una espátula de acero inoxidable estéril para homogenizar el sistema. Posterior a esto, el frasco se cerró durante 1 hora con la finalidad de que el producto se disperse homogéneamente. Finalmente, se añadió los 375 g de muestra de suelo restante y se volvió a mezclar una vez al día durante 5 días en condiciones de esterilidad.

Los tratamientos quedaron conformados de la siguiente forma: Control abiótico (Suelo contaminado + Ramnolípidos), Control negativo (Suelo contaminado + Inóculo), Control positivo (Suelo contaminado + Inóculo + Tween 80) y Prueba (Suelo contaminado + Inóculo + Ramnolípidos). El resumen de los tratamientos se evidencia en la Tabla 1.

Los ensayos fueron incubados a temperatura ambiente y se removieron cada 72 horas con una espátula estéril de acero inoxidable. Cabe resaltar que cada tratamiento fue ajustado a un porcentaje de humedad igual al 35% del volumen total de suelo (Ángeles & Refugio, 2013).

Tabla N° 1 Ensayos de biorremediación de hidrocarburos a nivel de microcosmos

Microcosmos	Suelo Estéril (g)	Petróleo Crudo 5% P/P (g)	Volumen de Inóculo (ml)	Ramnolípido (ml)	Surfactante Comercial Tween 80 (ml)
Control abiótico	475	25	-	1x CMC	-
Prueba	475	25	50	1x CMC	-
Control positivo	475	25	50	-	1x CMC
Control negativo	475	25	50	-	-

2.4.8 Evaluación del tratamiento de biorremediación

Los análisis se realizaron a los 0 y 15 días de incubación, en los cuales se evaluaron ciertos parámetros como: Recuento de aerobios mesófilos, hidrocarburos totales de petróleo, concentración de ramnolípidos temperatura, porcentaje de humedad y pH.

2.4.8.1 Recuento de bacterias aerobias mesófilas

Se recolectó una muestra de 10 g y se diluyó en 90 mL de solución salina estéril al 0.85% (S.S), teniendo así una primera dilución 10^{-1} , luego de incubar por 5 minutos a 100 rpm, se

realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} en tubos con 9 mL del mismo diluyente. Finalmente se inoculó 0.1 mL de cada dilución y se sembró por diseminación en agar de recuento en placa (APC), cada uno por duplicado. Las placas se incubaron a 30°C por 24 a 48 horas para su posterior recuento. (Merino, 1998)

2.4.8.2 Extracción y cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo

Para la extracción y cuantificación de HTP se empleó una modificación de la metodología descrita por (Schwab et al., 1999). Se recolectó 1 g de muestra a la cual se le adicionó 2 g de Na_2SO_4 y 5 mL de CH_2Cl_2 . Esta mezcla se colocó en un tubo de centrifuga de 15 mL, se agitó en un vórtex durante 1 minuto y posteriormente se centrifugó a 6 500 rpm por 20 minutos. Al finalizar el proceso, el sobrenadante fue recuperado vertiéndolo en un recipiente de vidrio previamente secado y pesado. La recuperación del sobrenadante se repitió tres veces, adicionando 5 mL más de CH_2Cl_2 a cada precipitado obtenido en el ciclo anterior. Finalmente, con la finalidad de evaporar el disolvente y recuperar los hidrocarburos totales de petróleo, el sobrenadante recuperado de los 3 ciclos se secó en una estufa a una temperatura constante de 40°C y se pesó en una balanza analítica. La concentración de HTP en 500g de muestra, se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$HTP(g) = 500 * (PrH - Pr) / PM$$

Donde:

PrH: Peso del recipiente seco + HTP

Pr: Peso del recipiente seco

PM: Peso de la muestra

2.4.8.3 Extracción y dosaje de ramnolípidos

La extracción de ramnolípidos de los microcosmos, se realizó mediante una modificación de la metodología descrita por (Noordman et al., 1998), empleando una solución electrolítica compuesta por 10 mM KNO_3 , 10 mM Tris-HCl, y 3 mM NaN_3 pH 7.0 en una relación de solución/suelo (p/v) 1:2. Se añadió 10 mL de la solución electrolítica en un tubo Pyrex de 22 x 175 mm con 5 g de muestra y se incubó en agitación durante 3 días a 240 rpm y temperatura ambiente. Luego, se continuó incubando durante 2 días más, pero esta vez, sin agitación alguna en las mismas condiciones de temperatura. Al finalizar este proceso, se

procedió a filtrar la solución por un filtro de membrana de 0.22 μm (Ángeles & Refugio, 2013).

El extracto obtenido se empleó para dosar la cantidad de ramnosa, empleando el método colorimétrico para la detección de azúcares con resorcinol (Monsigny et al., 1988). En un tubo de ensayo Pyrex de 16 x 100 mm se agregó 0.3 mL de la muestra a analizar, 0.3 mL de solución de resorcinol (0.06 g en 10 mL de Agua destilada) y 1.5 mL H_2SO_4 al 75%, realizando este proceso en oscuridad. Inmediatamente después, el tubo con todo el contenido se incubó en un baño maría a 4 °C para luego completar la reacción en otro baño maría a 90 °C durante 30 minutos. Finalmente, se realizó la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro UV- VIS GENESYS 150 a una longitud de onda de 480 nm (Wang et al., 2007). Debido a que la concentración de ramnolípidos es equivalente a la concentración de ramnosa, esta se obtuvo empleando una curva de calibración de densidad óptica versus ramnosa en g/L.

2.4.8.4 Medición de pH

Se mezcló 1 g de muestra en 50 mL de agua destilada y se centrifugó a 10 000 rpm por 30 minutos, posteriormente se midió el pH del sobrenadante empleando un potenciómetro HANNA. (Bocángel, 2016).

2.4.8.5 Medición de la humedad

El porcentaje de humedad del suelo se obtuvo empleando el método gravimétrico (Schmugge et al., 1980). Se pesó 25 g de muestra en una placa de Petri previamente pesada, y se secó a 105°C en una estufa eléctrica durante una hora o hasta tener un peso constante. Para obtener el porcentaje de humedad se aplicará la siguiente fórmula:

$$H\% = ((Mh - Mi)/(Ms - Mr)) \times 100$$

Donde:

Mh: Peso del recipiente más la muestra de suelo húmedo

Ms: Peso del recipiente más la muestra de suelo seca

Mr: Peso del recipiente seco

2.4.8.6 Medición de la temperatura

La temperatura del suelo se midió de manera directa empleando un termómetro digital calibrado de 0 a 100°C.

2.4.9 Análisis estadístico

Los resultados de la reducción de HTP a los 15 días de tratamiento, fueron analizados mediante la prueba de ANOVA de una sola vía y la diferencia entre los grupos se determinó mediante la prueba de comparaciones múltiples con test de Dunnett analizadas por el programa GraphPad Prism 9 (Graph Pad, San Diego, California). Los datos se consideran estadísticamente significativos con un $p < 0.05$ según test de Dunnett, y los resultados se representaron con la media y la desviación estándar de la misma.

3 RESULTADOS

3.1 ESTERILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL SUELO

En la Tabla 2 podemos observar que el proceso de irradiación eliminó las comunidades bacterianas propias del suelo, lo cual garantizó que la actividad hidrocarbonoclástica evaluada en los ensayos de remediación, fue propia del consorcio microbiano y no de otras bacterias.

Tabla N° 2 Recuento de bacterias totales en UFC/g de suelo para suelo irradiado y no irradiado

Condición del suelo	Muestra	Bacterias totales (UFC/g)
Suelo irradiado	Muestra 1	< 10
	Muestra 2	< 10
	Muestra 3	< 10
Suelo no irradiado	Muestra 1	4.09×10^8
	Muestra 2	4.09×10^8
	Muestra 3	4.09×10^8

Así mismo, los resultados de la caracterización fisicoquímica, en la cual está incluida los análisis de macronutrientes del suelo, condiciones de habitabilidad y caracterización del suelo, mostrados en la tabla 3, tabla 4 y tabla 5, nos permite inferir que se proporcionaron los nutrientes suficientes para sostener el crecimiento microbiano.

Tabla N° 3 Resultados de los macronutrientes de la muestra de suelo

Muestra	Fósforo (mg/Kg)	Potasio (mg/Kg)	Nitrógeno (mg/Kg)
Suelo con petróleo crudo estéril	1416.33	2891.97	894.21

Tabla N° 4 Resultados de las condiciones de la habitabilidad de la muestra de suelo

Muestra	pH (1:2) U. pH	Materia orgánica %p/p	Carbono orgánico %p/p
Suelo con petróleo crudo estéril	7.75	8.34	4.84

Tabla N° 5 Resultados de las condiciones de la caracterización del suelo

Muestra	Arena %p/p	Limo %p/p	Arcilla %p/p	Textura
Suelo con petróleo crudo estéril	55	15	30	Franco Arcilloso Arenoso

3.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROCARBONOCLÁSTICA

La tabla 6 muestra los resultados de la absorbancia inicial y final de cada cepa después de haber sido incubadas durante 7 días. Se observa que las cepas codificadas como *Pseudomonas aeruginosa* 3K-6, *Pseudomonas aeruginosa* IT4B-3, *Pseudomonas aeruginosa* 2K-1, *Burkholderia cepacia* 22b y *Burkholderia cepacia* IIBA4-5(25), obtuvieron los porcentajes de variación positiva de absorbancia más altos con respecto a las otras cepas evaluadas y por ende una mayor cantidad de biomasa microbiana. Así mismo, dichas cepas, debido a que superaron el 50% de la variación, fueron seleccionadas como posibles candidatas para la conformación del consorcio microbiano. Por otro lado, las cepas *Aeromonas hydrophila* 2K-3, *Pseudomonas aeruginosa* L1TA1, *Pseudomonas aeruginosa* 1B1 (49), *Burkholderia cepacia* 4B14, *Pseudomonas aeruginosa* 19, *Burkholderia cepacia* IIBA2-4 y *Pseudomonas aeruginosa* IA3K2(B), no exhibieron crecimiento alguno en el medio de cultivo ensayado, por lo cual fueron excluidas para los ensayos posteriores.

Tabla N° 6 Medidas de absorbancia y variación porcentual para cada cepa evaluada durante 7 días de incubación

Cepa	Absorbancia total	Absorbancia final	%Variación
<i>P. aeruginosa</i> M1AA25B	0.097	0.143	47.423
<i>A. hydrophila</i> 2K-3	0.163	0.091	-44.172
<i>P. aeruginosa</i> L1TA1	0.382	0.332	-13.089
<i>P. aeruginosa</i> 1B1	0.155	0.145	-6.452

(49)

<i>P. aeruginosa</i> 3K-6	0.113	0.24	112.389
<i>C. indologenes</i> IA1-B-5	0.11	0.13	18.182
<i>P. aeruginosa</i> IT4B-3	0.247	0.494	100
<i>P. aeruginosa</i> 4BH-2	0.142	0.182	28.169
<i>B. cepacia</i> 4B14	0.112	0.112	0
<i>P. aeruginosa</i> 19	0.225	0.174	-22.667
<i>P. aeruginosa</i> 2K-1	0.025	0.095	280
<i>B. cepacia</i> IIBA2-4	0.134	0.134	0
<i>B. cepacia</i> 22b	0.319	0.538	68.652
<i>P. aeruginosa</i> IA3K2(B)	0.16	0.139	-13.125
<i>B. cepacia</i> IIBA4-5(25)	0.195	0.432	121.539

En la tabla 7, se muestran los valores de biomasa microbiana en g/L inicial y final para las cinco cepas candidatas, a los 0 días y 7 días de incubación, respectivamente, los cuales se obtuvieron mediante el empleo de una curva de calibración de Biomasa g/L vs Absorbancia a 620 nm. De estos resultados, se resalta a la cepa *B. cepacia* 22b, de la cual se obtuvo 0.562 g/L de biomasa final, siendo el valor más alto. Por otro lado, la cepa *P. aeruginosa* IT4B-3, fue la que obtuvo una mayor variación porcentual, es decir, la biomasa a los 7 días de incubación aumentó en un 52% con respecto a la concentración inicial.

Tabla N° 7 Medidas de absorbancia y variación porcentual para cada cepa evaluada durante 7 días de incubación

Cepa	Biomasa inicial g/L	Biomasa final (g/L)	%Variación
<i>P. aeruginosa</i> 3K-6	0.2814	0.339	20.47
<i>P. aeruginosa</i> IT4B-3	0.252	0.384	52.72
<i>P. aeruginosa</i> 2K-1	0.197	0.229	15.97
<i>B. cepacia</i> 22b	0.370	0.562	52.12
<i>B. cepacia</i> IIBA4-5(25)	0.208	0.281	34.95

3.3 PRUEBAS DE ANTAGONISMO Y SELECCIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO PARA EL TRATAMIENTO DE BIORREMEDIACIÓN

Después de un periodo de incubación de 24 – 48 horas, la cepa *B. cepacia* IIBA4-5(25) fue la única cepa que formó halos de inhibición en cada repetición, cuando fue enfrentada con las demás. Estos resultados se registran en la tabla 8 y en la figura 1.

Tabla N° 8 Interpretación cualitativa de la prueba cuantitativa de la prueba de antagonismo

Cepas	<i>P. aeruginosa</i> IT4B-3			<i>P. aeruginosa</i> 2K-1			<i>B. cepacia</i> 22b			<i>B. cepacia</i> IIBA4-5(25)			<i>P. aeruginosa</i> 3K-6		
<i>P. aeruginosa</i> IT4B-3	X	X	X	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 2K-1	-	-	-	X	X	X	-	-	-				-	-	-
<i>B. cepacia</i> 22b	-	-	-	-	-	-	X	X	X				-	-	-
<i>B. cepacia</i> IIBA4-5(25)										X	X	X			
<i>P. aeruginosa</i> 3K-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X

-: No presenta inhibición
|: Presenta Inhibición
X: Espacios en blanco

Debido a estos resultados, las cepas *P. aeruginosa* IT4B-3, *P. aeruginosa* 2K-1, *B. cepacia* 22b y *P. aeruginosa* 3K-6 fueron seleccionadas para conformar el consorcio microbiano con capacidad hidrocarbonoclástica, mientras que la cepa *B. cepacia* IIBA4-5(25) fue excluida de la misma por presentar antagonismo entre las demás.

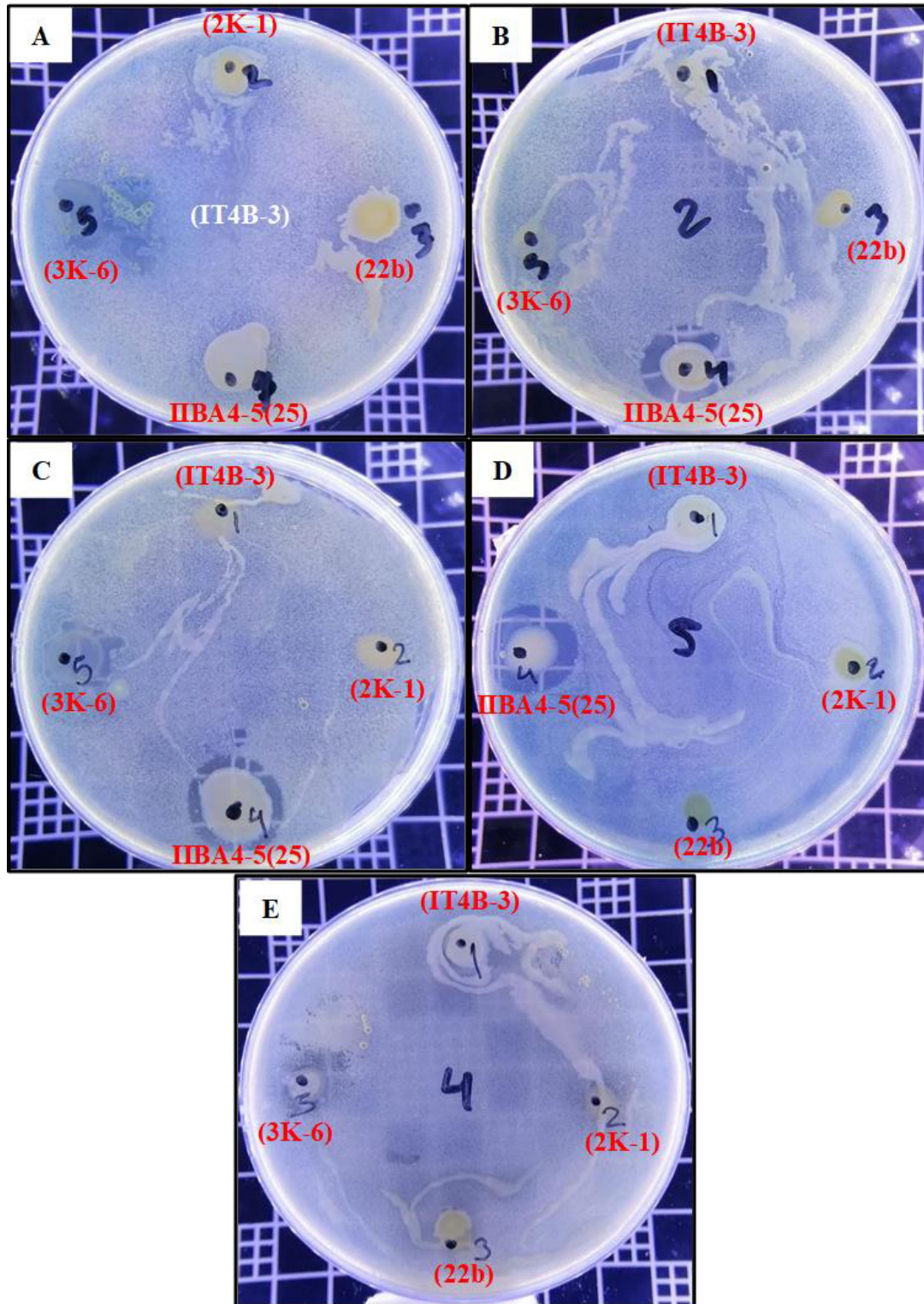


Figura N°1 Pruebas de antagonismo por el método de la bicapa de las cinco cepas con capacidad hidrocarbonoclástica. A) Actividad antagonista con la cepa testigo IT4B-3. B) Actividad antagonista con la cepa testigo 2K-1. C) Actividad antagonista con la cepa testigo 22b. D) Actividad antagonista con la cepa testigo 3K-6. E) Actividad antagonista con la cepa testigo IIBA4-5(25).

3.4 TOXICIDAD DEL RAMNOLÍPIDO

En la figura 2, se observan los resultados obtenidos para la prueba toxicidad empleando la cepa *P. aeruginosa* IT4B-3, en los días 1, 7 y 14, con cada enmienda ensayada. Por un lado, los controles muestran resultados similares a lo largo del proceso, obteniendo un valor final de 0.1531 g/L y 0.1520 g/L de biomasa microbiana, para el control negativo y positivo, respectivamente. Por otro lado, la enmienda a 0.8 g/L de ramnolípido tuvo una ligera caída en el día 7 (0.1370 g/L a 0.1351 g/L), sin embargo, la biomasa final resultante fue de 0.1668 g/L. Finalmente, la enmienda de 80 g/L, mostró un incremento progresivo del crecimiento microbiano, obteniendo un valor final de 0.3046 g/L de biomasa, situándose como el valor más alto, para esta cepa en particular.

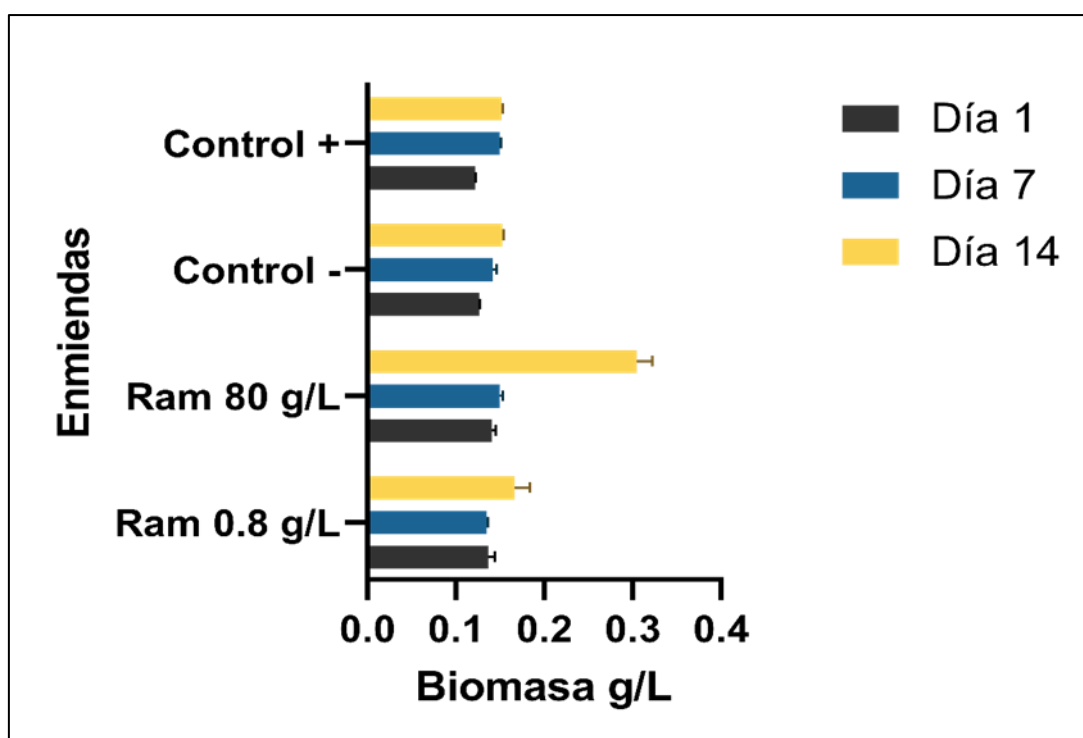


Figura N°2 Ensayos de toxicidad del ramnolípido empleando la cepa *P. aeruginosa* IT4B-3. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.

En la figura 3, se observan los resultados obtenidos para la prueba toxicidad empleando la cepa *P. aeruginosa* 2K-1, en los días 1, 7 y 14, con cada enmienda ensayada. En primer lugar, los valores del control negativo se mantuvieron casi constantes a lo largo del proceso, siendo, 0.1895 g/L y 0.1965 g/L de biomasa, los resultados en los días 1 y 14, respectivamente. En el caso del control positivo, hubo una ligera variación de siendo 0.1900 g/L el valor inicial y 0.2345 g/L, el final. Por otro lado, la enmienda a 0.8 g/L de ramnolípido,

mostraron valores similares al control negativo, obteniendo 0.1927 g/L, 0.1985 g/L y 0.1947 g/L de biomasa microbiana, en los días 1, 7 y 14 respectivamente, lo cual implica una baja tasa del crecimiento celular. Finalmente, en la enmienda ensayada a 80 g/L, los valores de biomasa microbiana fueron los más elevados para esta cepa en particular, reflejando un aumento progresivo del crecimiento microbiano con un valor inicial de 0.2021 g/L, 0.2255 g/L en el día 7 y 0.2937 g/L, en el día 14.

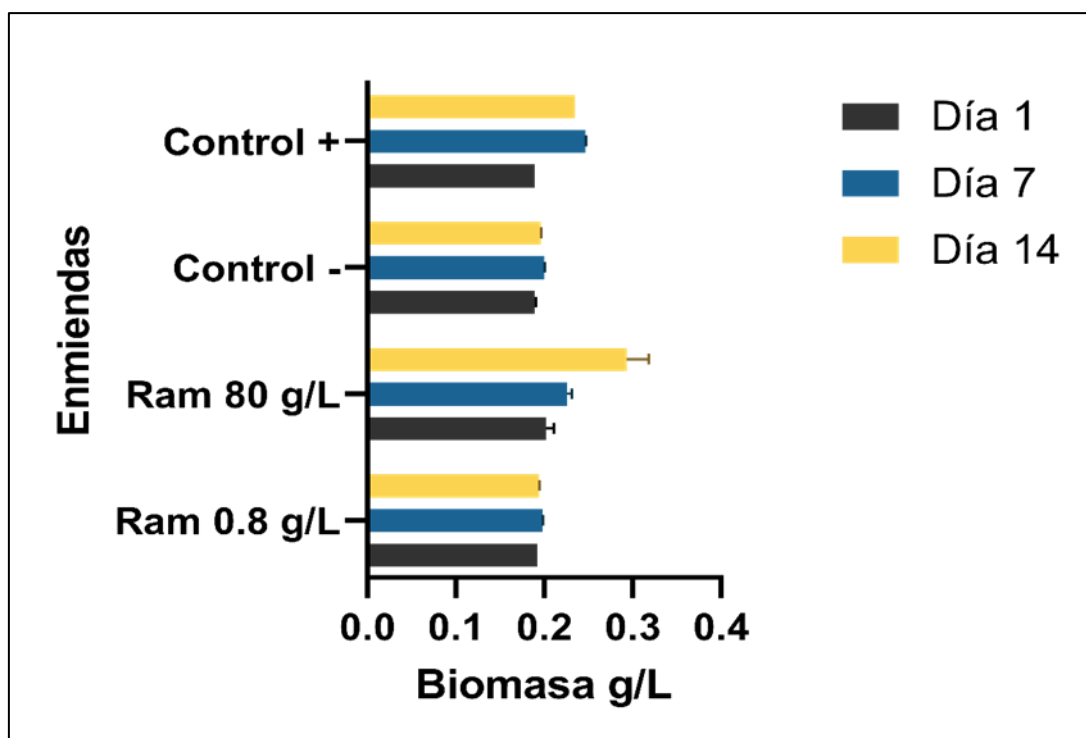


Figura N°3 Ensayos de toxicidad del ramnolípido empleando la cepa *P. aeruginosa* 2K-1. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.

En la figura 4, se observan los resultados obtenidos para la prueba toxicidad empleando la cepa *B. cepacia* 22b, en los días 1, 7 y 14, con cada enmienda ensayada. En primer lugar, los valores del control negativo se mantuvieron constantes a lo largo del ensayo siendo, 0.0988 g/L, 0.1058 g/L y 0.1019 g/L de biomasa microbiana en los días 1, 7 y 14, respectivamente. En el caso del control positivo, se observó un crecimiento progresivo, partiendo de un valor inicial de 0.0983 g/L y un final de 0.2162 g/L de biomasa. Por otro lado, los resultados para la enmienda a 0.8 g/L de ramnolípido, fueron valores constantes, obteniendo un valor inicial de 0.1221 g/L, un intermedio de 0.1120 g/L y un final de 0.1221 g/L, reflejando así una baja tasa de crecimiento celular. Finalmente, con una enmienda de 80 g/L de ramnolípido, se obtuvieron valores de biomasa ascendentes, siendo 0.1736 g/L el

valor inicial y 0.6833 g/L el final, siendo este resultado el más alto para esta cepa y para las demás evaluadas.

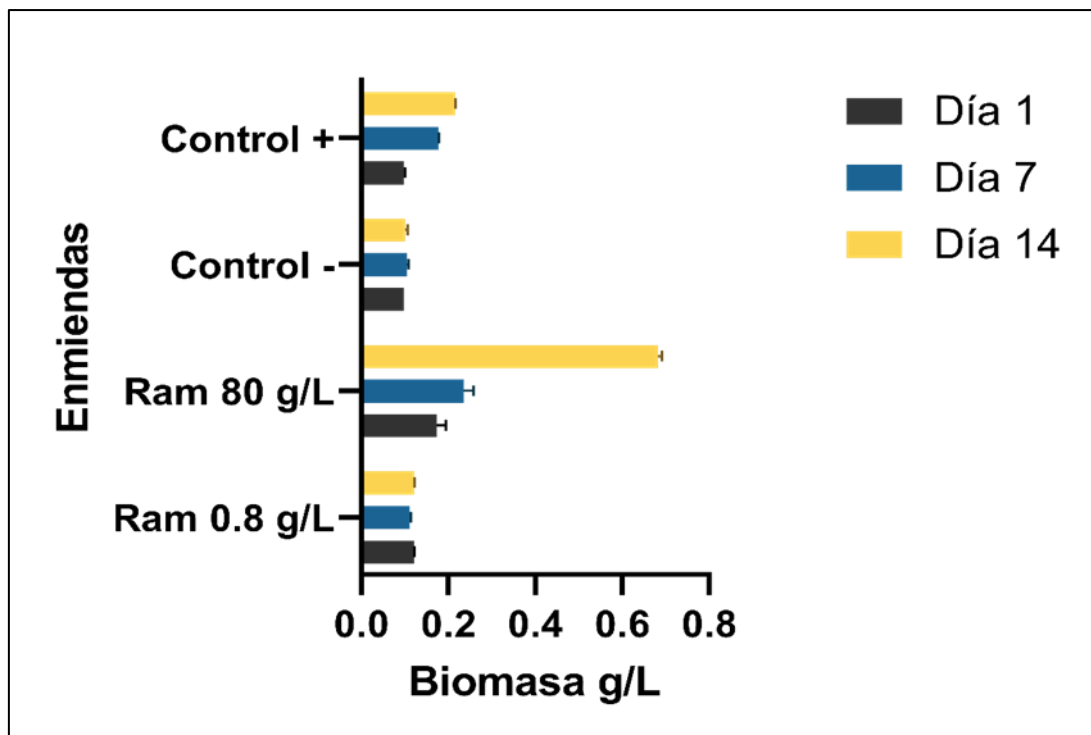


Figura N°4 Ensayos de toxicidad del ramnolípido empleando la cepa *B. cepacia* 22b. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.

Finalmente, en la figura 5, se observan los valores de biomasa obtenidos para la cepa *P. aeruginosa* 3K-6 en los días 1, 7 y 14, con cada enmienda ensayada. Los valores de biomasa para los controles tanto positivo y negativo fueron casi constantes, siendo 0.2001 g/L y 0.2426 g/L los valores iniciales y finales de biomasa para el control negativo y 0.2467 g/L y 0.2466 g/L para el control positivo. En el caso de la enmienda a 0.8 g/L de ramnolípido, los valores se mantuvieron constantes a lo largo del ensayo obteniendo un valor inicial de 0.2346 g/L, un intermedio de 0.2342 g/L y un valor final de 0.2312 g/L. Por último, los resultados para la enmienda a 80 g/L de ramnolípido, fueron progresivos, siendo 0.2498 g/L, 0.2621 g/L y 0.28 g/L los valores a iniciales intermedios y finales, respectivamente.

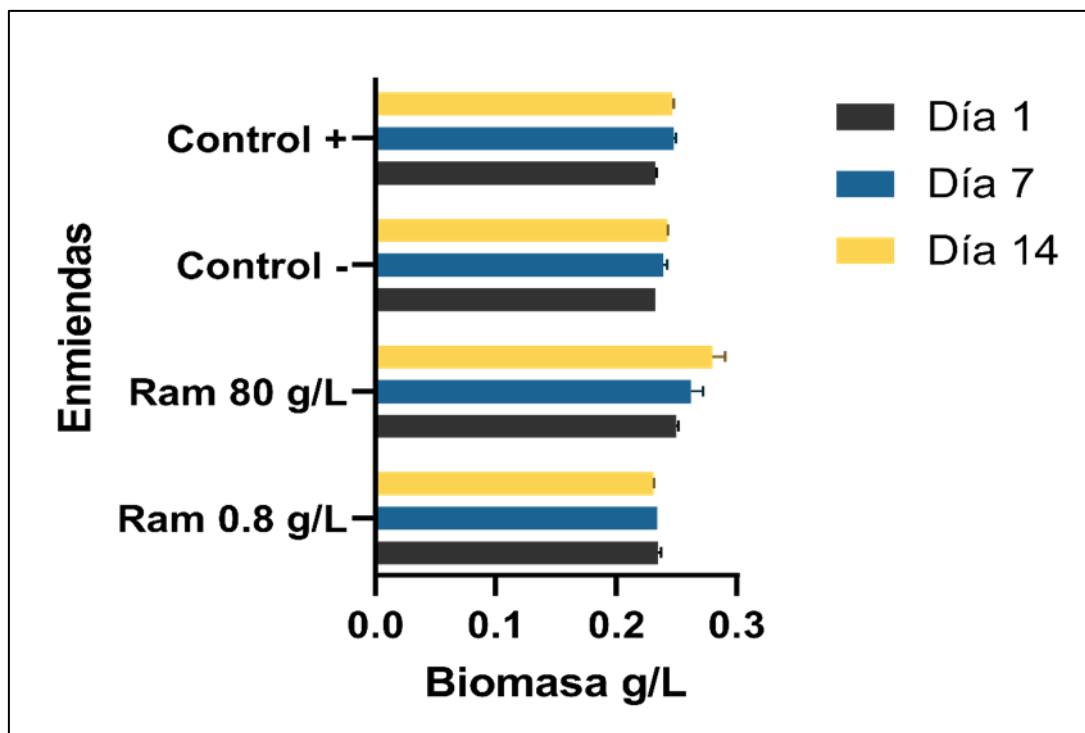


Figura N°5 Ensayos de toxicidad del ramnolípido empleando la cepa *P. aeruginosa* 3K-6. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.

3.5 ENSAYOS DE BIORREMEDIACIÓN

3.5.1 Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos evaluados en el proceso de biorremediación fueron humedad, temperatura y pH para cada sistema teniendo resultados a los 0 días y 15 días de incubación. En la figura 6, se puede observar que los valores del porcentaje de humedad en el tiempo cero oscilaron entre 40.033 y 47.380 % mientras que a los 15 días se produjo una reducción de estos valores en cada ensayo con excepción del control abiótico, teniendo un rango de entre 39.594 y 41.258 %. Así mismo, se observa que la mayor reducción de la humedad a los 15 días se registró en el ensayo de prueba.

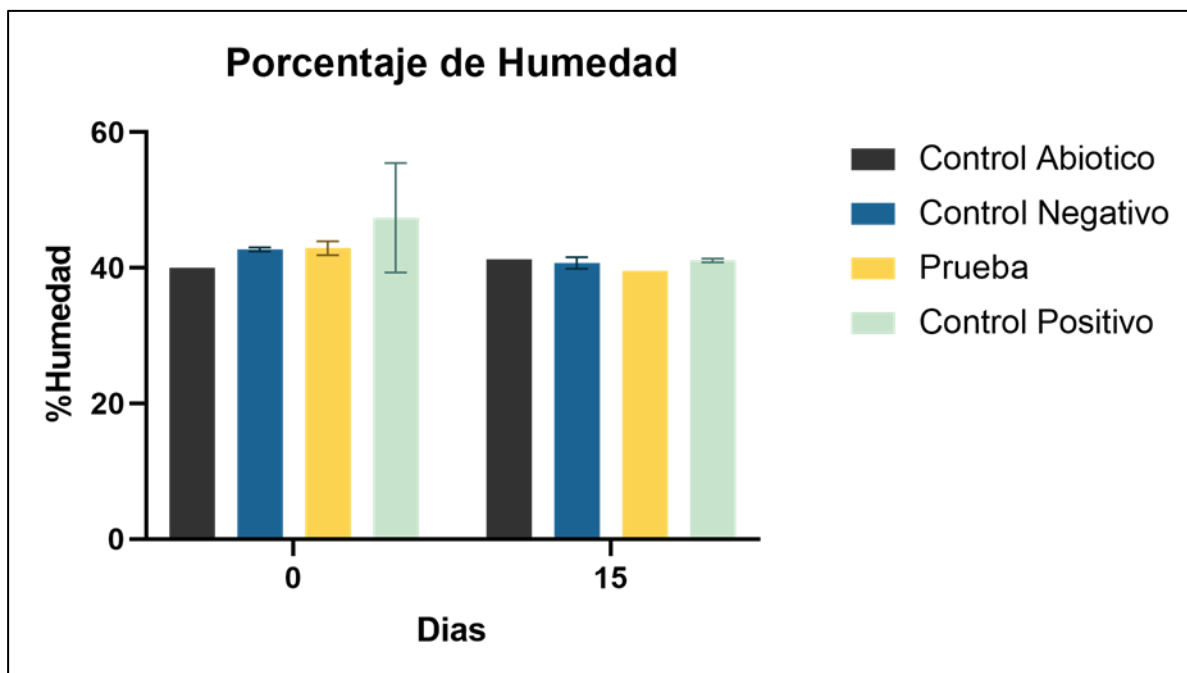


Figura N°6 Porcentaje de humedad tomados al inicio y al final del tratamiento de biorremediación durante 15 días. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.

En cuanto al pH, se registró una ligera variación con tendencia a la alcalinidad, teniendo un máximo valor de 8.34 en el ensayo de prueba, pero un mayor cambio en el control abiótico. En general, los rangos de la variación del pH fueron desde 6.08 hasta 8.34. Los resultados de este ensayo se observan en la figura 7.

En el caso de la temperatura, los valores se mantuvieron relativamente constantes entre 22° C y 23° C en todos los ensayos, teniendo en cuenta que la temperatura de incubación fue ambiental. Los resultados se muestran en la figura 8.

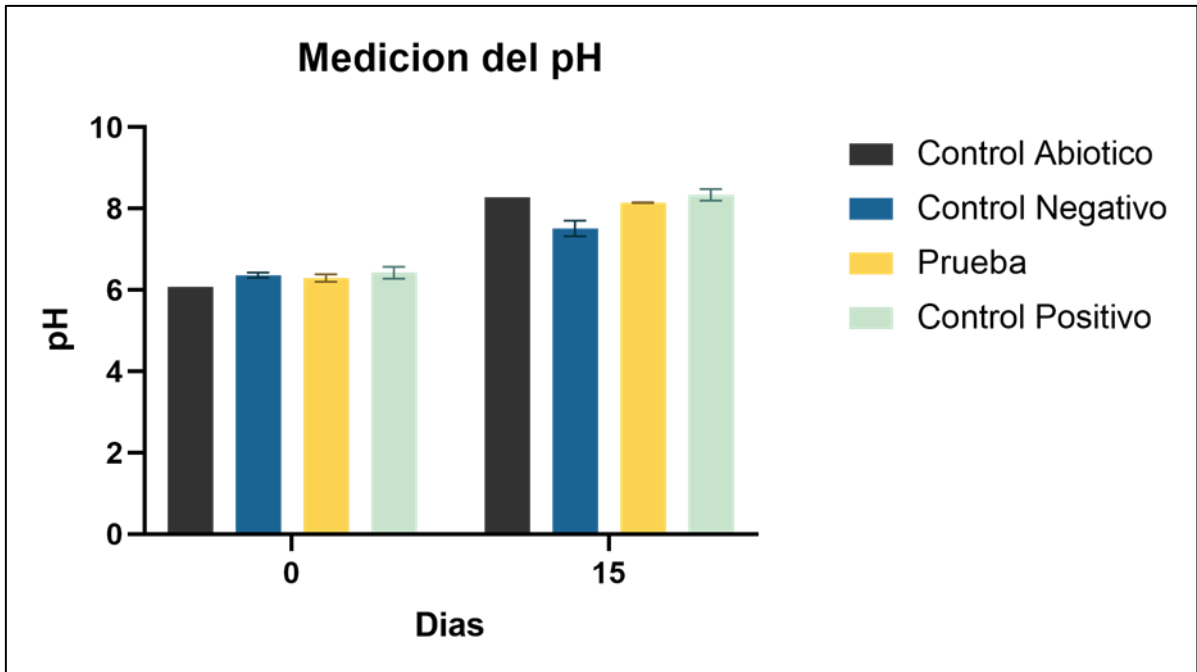


Figura N°7 Medición del pH tomados al inicio y final del tratamiento de biorremediación durante 15 días. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.

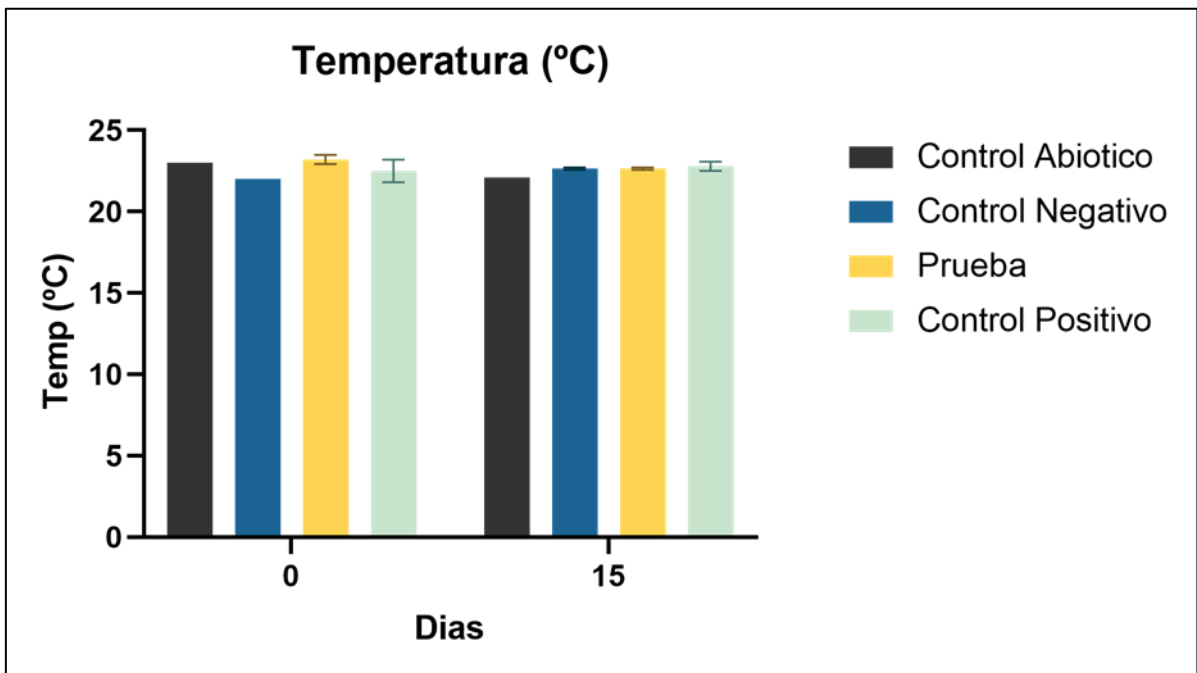


Figura N°8 Medición de la temperatura tomados al inicio y final del tratamiento de biorremediación durante 15 días. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra

3.5.2 Recuento de bacterias aerobias mesófilas

El recuento bacteriano se realizó al inicio y al final del proceso de remediación biológica, el cual duro 15 días. En la figura 9, se puede observar los valores obtenidos de UFC/g de suelos expresados en logaritmo natural. La población bacteriana inicial se mantuvo en un rango de 3.95×10^5 UFC/g a 3.75×10^6 UFC/g con excepción del tratamiento abiótico el cual presento <10 UFC/g; sin embargo, a los 15 días se registró un considerable aumento de la población microbiana en este último ensayo, pero no supero los valores de los otros tratamientos. En el caso del ensayo de prueba, se evidencio una ligera reducción obteniendo un valor final de 2.74×10^6 UFC/g. Por otro lado, el mayor aumento de la población bacteriana se registró en el control positivo iniciando con un valor de 3.95×10^5 UFC/g y finalizando con 2.72×10^6 UFC/g. Finalmente, en el caso del control negativo la variación fue positiva, pero con un aumento muy poco significativo pasando de 17.83×10^5 UFC/g a 18.88×10^5 UFC/g.

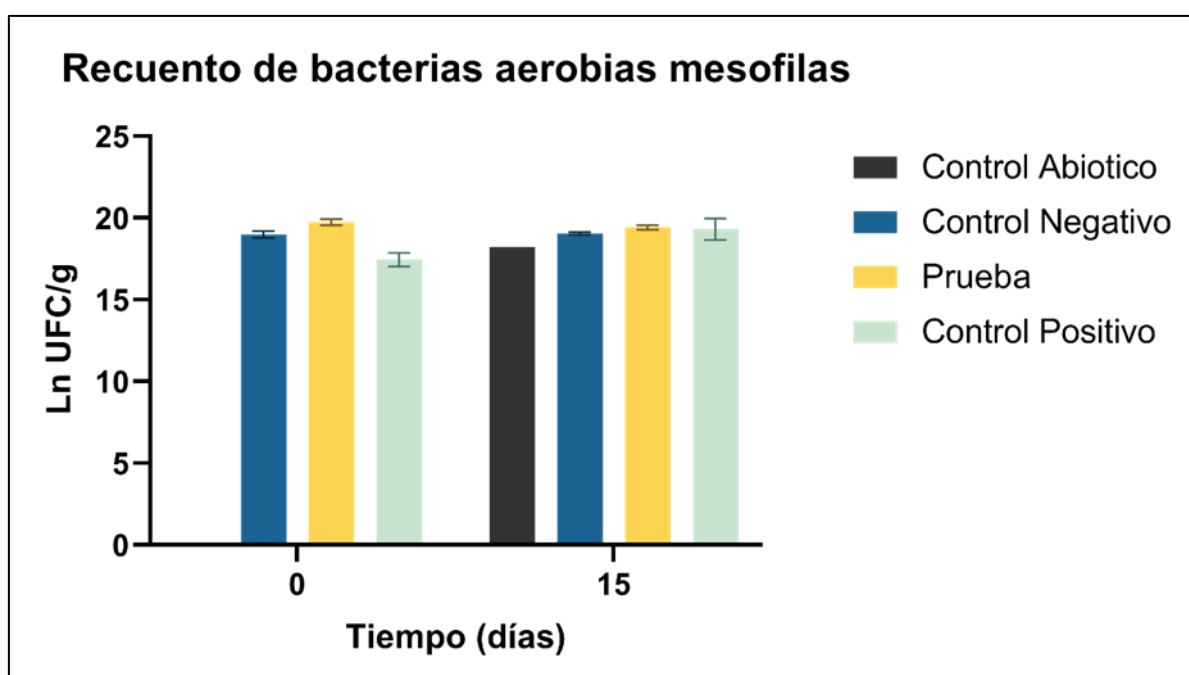


Figura N°9 Recuento de bacterias aerobias mesófilas a los 0 y 15 días en los diferentes tratamientos de biorremediación. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.

3.5.3 Cuantificación de ramnolípidos

Se realizó una cuantificación de la concentración de ramnolípidos a lo largo del proceso de remediación con la finalidad de evaluar si existía o no una variación de esta en cada ensayo realizado. En la figura 10, se observa que los cuatro procesos empezaron con una concentración que oscila entre 88.177 g/Kg y 208.237 g/Kg de suelo, siendo la

concentración más baja para el control negativo y la más alta para el control positivo. En el caso de los otros ensayos, tanto el control abiótico y el control positivo presentan concentraciones muy similares de 126.021 g/Kg y 128.592 g/Kg. Al transcurrir 15 días de proceso, las concentraciones del control negativo, control abiótico y el ensayo de prueba, tuvieron un aumento poco significativo cuyos valores en promedio fueron 115.62 g/Kg, 165.223 g/Kg y 139.08 g/Kg, respectivamente. En el caso del control positivo, notamos que la concentración de biosurfactante reduce notablemente, obteniendo un valor final de 90.092 g/Kg.

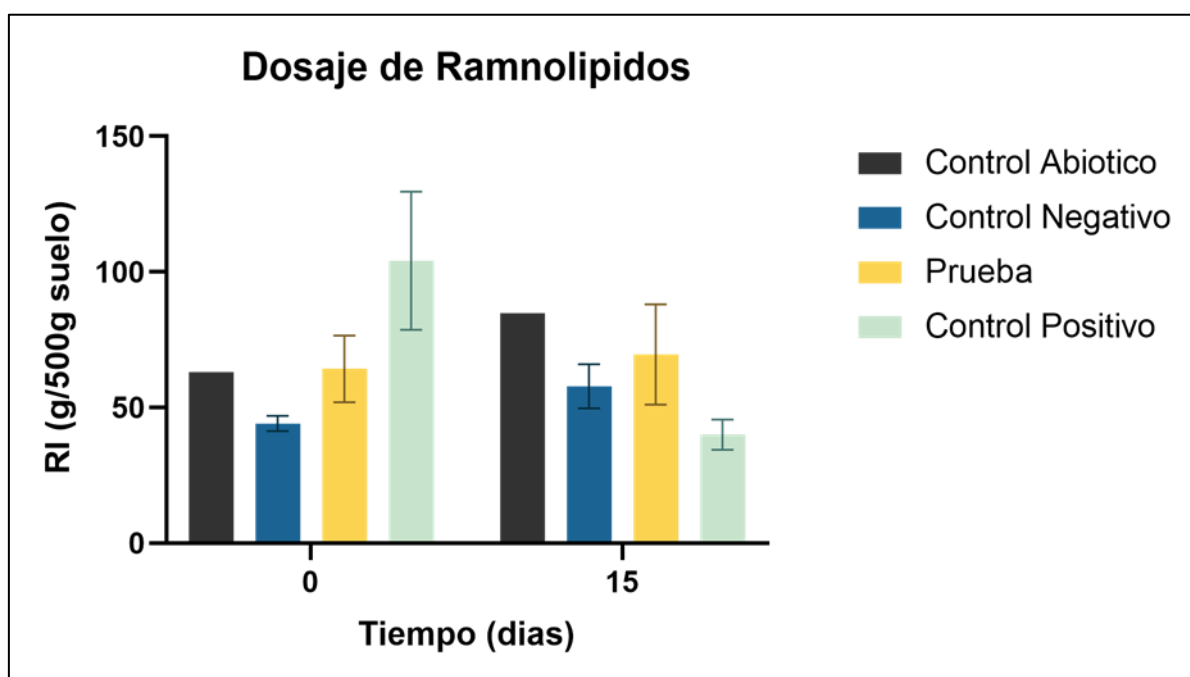


Figura N°10 Concentración de ramnolípidos a los 0 y 15 días en los diferentes tratamientos de biorremediación. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.

3.5.4 Cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo

Para los ensayos de biorremediación se decidió emplear una concentración inicial de petróleo de 25 g/500 g de suelo, estos valores se ven reflejados en las muestras iniciales tomadas en el tiempo cero, las cuales oscilan entre 20 y 30 g de HTP/500 g de suelo. En la figura 11, se observan las concentraciones iniciales y finales de HTP para cada ensayo, después de 15 días de incubación. El control positivo evidenció una concentración final de 12.904 g HTP/500 g, siendo el ensayo que más redujo en comparación con los demás, mientras que, en segundo lugar, el ensayo de prueba obtuvo una concentración final de 15.895 g HTP/500 g de suelo. Por otra parte, las concentraciones finales para el control negativo y el control abiótico fueron de 26.12 y 19.55 g HTP/500 g de suelo

respectivamente; cabe resaltar que como se aprecia en la figura 11, las barras de error expuestas en el control negativo, se debe a la diferenciación entre los valores de las repeticiones iniciales de cada muestra, hecho por el cual se muestra la media de estas mismas. En la tabla 9, se pueden observar los valores de concentración inicial y final de HTP obtenidos para cada ensayo después de 15 días de tratamiento.

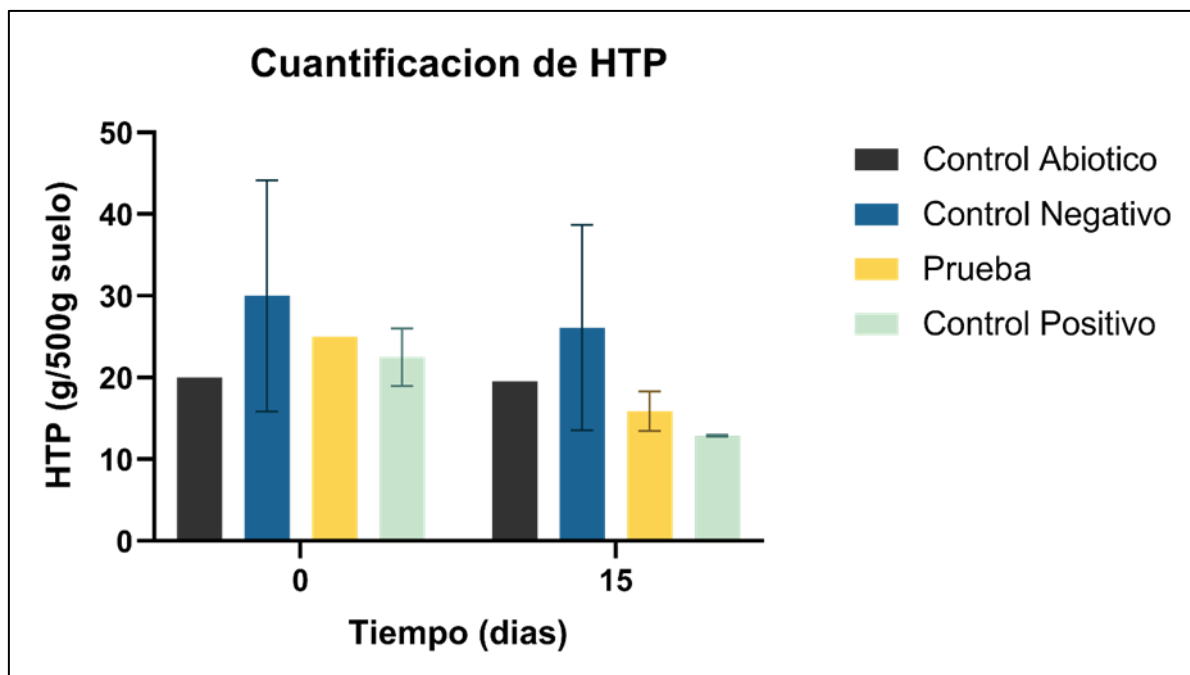


Figura N°11 Concentración de HTP a los 0 y 15 días en los diferentes tratamientos de biorremediación. Los resultados se expresan como la media dos repeticiones cuyo error se expresa en líneas sobre cada barra.

Tabla N° 9 Concentración de HTP para cada tratamiento al cabo de 15 días

Muestra	HTP iniciales (g/500 g de suelo)	HTP finales (g/500 g de suelo)	Reducción (g)	%Reducción
Control abiótico	20.000	19.550	0.450	2.25
Control negativo	30.000	26.121	3.879	12.93
Prueba	25.000	15.895	9.105	36.42
Control positivo	22.500	12.904	9.596	42.65

Para la obtención de los porcentajes de reducción netos, se descontó el valor de la reducción en gramos de hidrocarburo del control abiótico a cada tratamiento, con la finalidad de obtener valores reales de degradación. Como resultado final, se alcanzó una reducción neta de 9.146 g de HTP por parte del control positivo, posicionándose como el tratamiento

con mayor porcentaje de reducción, logrando un 40.648%, seguido por el tratamiento de prueba, el cual redujo 8.655 g de HTP con un 34.628% y en último lugar, el control negativo logró reducir solo 3.429 g de HTP, equivalente al 11.430% de los hidrocarburos totales. Estos resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla N° 10 Reducción y porcentaje de reducción real de HTP para cada tratamiento al cabo de 15 días

Muestra	Reducción neta de HTP (g)	%Reducción neto
Control negativo	3.429	11.430
Prueba	8.655	34.620
Control positivo	9.146	40.648

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de la prueba de ANOVA de una sola vía y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, se muestran en la tabla 12. El análisis estadístico realizado, nos muestra que no existe diferencias significativas para la reducción de HTP entre el tratamiento en el cual se utilizó Tween 80 como surfactante comercial (control positivo) y el tratamiento donde se emplearon ramnolípidos como biosurfactante (prueba), debido a que se obtiene un valor de $P=0.318$ entre columnas, ($p>0.05$) y cuando comparamos ambos tratamientos, se obtiene un valor de $P=0.8923$.

Tabla N° 11 Test de comparación múltiple de Dunnett reducción de los HTP

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value	C-?	
Control Positivo vs. Control Negativo	-13.22	-41.77 to 15.33	No	ns	0.2676	A	Control Negativo
Control Positivo vs. Prueba	-2.991	-31.54 to 25.56	No	ns	0.8923	B	Prueba

4 DISCUSIÓN

4.1 ESTERILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL SUELO

Se consiguió una esterilización exitosa empleando la técnica de irradiación de tipo gamma, debido a que el recuento de bacterias totales se mostró con valores menores a 1 UFC/g (Tabla 2). Ángeles et al. (2013), reportó el mismo fenómeno obteniendo valores similares a los antes mencionados, pero con el tiempo, estos fueron incrementando debido a una reactivación microbiana según las condiciones del medio, tal como posiblemente haya sucedido en nuestra experiencia la cual justifica el incremento de la biomasa microbiana del control abiótico. (Figura 9).

Con respecto a la caracterización fisicoquímica del suelo, los resultados de la concentración de macronutrientes (Tabla N°3) se compararon con la guía del Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Los niveles de fósforo se encontraron dentro la clasificación "Alto", del mismo modo que las concentraciones de potasio y nitrógeno, lo que representa una condición óptima de fertilidad (D.S. N° 017-2009-AG), además, el porcentaje de materia orgánica (Tabla N°4) infiere que el suelo presenta condiciones de habitabilidad altos, que puede estar compuesta por microorganismos con afinidad a condiciones de pH ligeramente básicas (Herrero, 2004).

Por otro lado, de acuerdo con Cookson (1995) las condiciones óptimas de biorremediación se rigen a una concentración de los nutrientes carbono, nitrógeno y fósforo en una proporción de 100:10:1, lo cual difiere del presente ensayo, ya que se obtuvo concentraciones iniciales en una proporción de 100:2:3. Esto podría ser un factor que afecte de cierta manera el metabolismo catalítico del consorcio hidrocarbonoclástico.

4.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROCARBONOCLÁSTICA

Se evaluó la actividad degradativa sobre hidrocarburos de petróleo a través del crecimiento de las cepas en un medio líquido con petróleo crudo, como fuente de carbono. Para tomar referencia del crecimiento microbiano, se utilizó el grado de turbidez en cada matraz ensayado mediante la lectura de la absorbancia a 620 nm (Terán, 2020).

Cinco de doce cepas (41.6%) presentaron una variación porcentual superior al 50% presentando valores de absorbancia máxima de 0.538 y mínima de 0.095 (Tabla 6). Estos resultados coinciden con lo reportado por Escalante (2002) y Samanez (2008) quienes obtuvieron un valor máximo de crecimiento comparable con la escala 3 de McFarland (0.3-0.5), pero menores que los descritos por Arenas (1999). Las diferencias entre las poblaciones con alta capacidad hidrocarbonoclástica se podría explicar debido a las

condiciones del ambiente de aislamiento, ya que mientras el proceso de evaluación realizado simuló un ambiente contaminado con petróleo crudo, Arenas (1999) realizó el aislamiento con contaminación crónica de petróleo sin tratamiento y por ende los continuos derrames en este último permiten que diferentes poblaciones se encuentren en la fase inicial de degradación, la cual se caracteriza por ser una fase de degradación rápida (Kaplan & Kitts, 2004).

Un factor importante para tomar en cuenta fue que para este ensayo se empleó una concentración de hidrocarburos al 2% ya que (Narvaez-Flores et al., 2008) reportó que una concentración al 2% de crudo de petróleo, inhibe el crecimiento del 50% de las cepas evaluadas, lo cual no coincide con este estudio debido a que si bien solo el 41.6% logró superar una variación porcentual por encima del 50%, el 66.6% de las cepas tuvieron una variación porcentual positiva, es decir, no se inhibieron (Tabla 6). Cabe resaltar que se necesita un estudio de mayor impacto para poder tener una muestra poblacional con mayor significancia.

4.3 PRUEBAS DE ANTAGONISMO Y SELECCIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO

En las pruebas de antagonismo microbiano se encontró que la cepa codificada como *B. cepacia* IIBA4-5(25) (Figura 1), presentó actividad antagonista frente a las demás cepas que fueron preseleccionadas para integrar el consorcio hidrocarbonoclástico, visualizándose la formación de un halo de inhibición en todas las repeticiones evaluadas. Cabe resaltar que todas las cepas fueron aisladas de una muestra de suelo de un mismo ambiente, por lo que es poco común encontrar agentes antagonistas en este tipo de casos ya que comparten un microbiota autóctono (Dopazo et al., 1988). Sin embargo, durante el proceso de contaminación de suelo con petróleo crudo, este estuvo en contacto directo con el ambiente, por lo que no se descarta la captación de un agente externo dentro de la muestra, lo cual coincide con lo reportado por Terán (2020) quien registró una cepa dentro de su consorcio el cual inhibió casi la totalidad de estas.

Si bien no hay estudios específicos que determinen el antagonismo entre cepas bacterianas relacionadas con la zona de estudio. La evaluación del antagonismo ha sido utilizada para la conformación de consorcios degradadores de otros compuestos orgánicos (Gaitán & Perez, 2007).

4.4 TOXICIDAD E INFLUENCIA DEL RAMNOLÍPIDO

Los ensayos realizados para evaluar la toxicidad del ramnolípido (Figura 2-5), en la cual se probaron dos concentraciones (0.8 g/L y 80 g/L), generaron una respuesta positiva al

evidenciarse crecimiento microbiano en ambos casos; es decir, no se detectó ningún grado de toxicidad por parte del biosurfactante hacia los microorganismos ensayados, concluyendo así su bajo nivel de toxicidad y mayor compatibilidad con la membrana celular, la cual la convierte en un excelente aditivo para la optimización de los procesos de remediación biológica del petróleo (Congiu & Ortega-Calvo, 2014; Bezza & Nkhalambayausi-Chirwa, 2015).

Así mismo, en todos los casos, el crecimiento microbiano tuvo un patrón similar en comparación con los tratamientos modificados con glucosa (control positivo). Estos resultados se contrastan con lo reportado por Wolf & Gan (2018) quienes emplearon la cepa *Mycobacterium vanbaalenii* para realizar determinar el nivel de toxicidad a los ramnolípidos previo a un ensayo de degradación de pireno.

También se pudo detectar, que los ensayos donde se empleó la concentración más alta de ramnolípidos (80 g/L), tres de las cepas (*P. aeruginosa* IT4B-3, *P. aeruginosa* 2K-1 y *B. cepacia* 22b), evidenciada por el incremento de la biomasa microbiana, tuvieron una asimilación de la fuente carbonada mucho más notoria que la del control positivo a los 14 días de incubación. Este resultado se puede justificar como normal, debido a que la glucosa al ser un monosacárido y a su vez, menos complejo de degradar, es consumida por los microorganismos en un periodo de tiempo mucho menor que una fuente carbonada compleja, tal como lo es el ramnolípidos, por ende, se puede inferir que a los 14 días de incubación, los controles positivos tenían la fuente carbonada casi agotada y los microorganismo empezaron a entrar a una fase de muerte, mientras que en los ensayos de prueba, la fuente carbonada ramnolipídica empezaba a degradarse asumiendo una fase de crecimiento exponencial.

Para poder evaluar si el ramnolípidos presenta una mejora del proceso de degradación de compuestos recalcitrantes, tal como son los hidrocarburos de petróleo, se adiciono el biosurfactante a un ensayo de remediación biológica para la cual se empleó un consorcio microbiano sin capacidad productora de ramnolípidos para así poder evaluar únicamente el ramnolípidos añadido y no los que puedan sintetizarse in situ.

En la figura 10, podemos observar que el ensayo de prueba mostró una concentración de ramnolípidos similar a cuando se inició el ensayo, es decir, no hubo ni reducción ni aumento significativo, lo cual llega a ser conveniente debido a que no es una fuente carbonada aprovechable en los primeros quince días del proceso de remediación y por ende, se infiere que los microorganismos aprovechan los carbonos provenientes de los hidrocarburos, los cuales serán más fáciles de degradar por la capacidad emulsificante del ramnolípidos (Liu et

al., 2017), por otro lado, el ramnolípido tendrá un mayor rango de acción a lo largo del tiempo.

En el caso del control positivo, se exhibe una reducción significativa del surfactante, sin embargo, este resultado no puede considerarse como fiable, debido a que en este ensayo se utilizó el surfactante Tween ® 80, el cual no presenta el azúcar en su estructura química, sino más bien un total de 20 óxidos de etileno por molécula (EMBL-EBI, 2014), lo cual hace imposible su cuantificación por alguna técnica colorimétrica (R. Zhang et al., 2012). Por ende, se deduce que el surfactante químico aún se encuentre presente en las mismas concentraciones que al iniciar la experimentación, ya que presentan una baja biodegradabilidad (Zeng et al., 2006).

4.5 ENSAYO DE BIORREMEDIACIÓN

En cuanto a la degradación de hidrocarburos totales de petróleo, se consideró la reducción de estos mismos, por parte del control abiótico, como un proceso de volatilización natural, hecho por el cual, los valores de degradación y porcentaje de reducción de HTP fueron recalculados, descontando a cada ensayo, dicha pérdida, tal como se evidencia en la tabla 10. Al recalcular estos valores se obtuvo una degradación de 9.146 g y 8.655g por cada 500 g de muestra de suelo contaminada para el control positivo y el ensayo de prueba respectivamente, los cuales son diferentes significativamente tal como lo demuestra la prueba de ANOVA en la tabla 12. Sin embargo, al contrastar estos resultados con el control negativo, tampoco existe diferencia significativa entre ellas, debido a que dicho tratamiento tuvo un inóculo microbiano con capacidad degradativa, el cual redujo significativamente, las concentraciones de hidrocarburos totales de petróleo iniciales.

Durante la experimentación, se decidió agregar una concentración de biosurfactante que correspondía al valor de su CMC, el cual se determinó en 8 g/L para el ramnolípido. Sin embargo, en el caso del surfactante comercial, sí bien se adicionó la misma concentración, este no correspondía al valor de su CMC ya que este mismo era de 0.01572×10^{-3} g/L, por ende, la concentración que se añadió fue de 500x el valor de su CMC aproximadamente. Esto explicaría el principal motivo por el cual el porcentaje de reducción fue más favorable para el surfactante químico que para el surfactante biológico. Hay que tener en cuenta que el valor del CMC es muy importante ya que es la concentración mínima de tensioactivo a partir del cual se forman micela en una disolución (Rehman et al., 2021), por lo cual, ayudara a solubilizar los compuestos hidrocarbonados y como consecuencia ser metabolizados, así como también la obtención de otros micronutrientes (Maia et al., 2019). Por ende, es posible inferir que si se emplea concentraciones más altas de ramnolípido se

pueda incrementar el rendimiento y el porcentaje de reducción de los hidrocarburos de petróleo, teniendo en cuenta que el ramnolípido empleado no ejerce toxicidad alguna inclusive a una concentración de 10 veces el valor de su CMC (80 g/L).

Así mismo, es conveniente mencionar el comportamiento microbiano a lo largo del proceso de remediación, cuyos valores se obtuvieron a partir del recuento de mesófilos aerobios, puesto que estos mismos manifiestan un crecimiento continuo en 15 días de tratamiento.

El crecimiento microbiano es un indicador importante, debido a que se encuentra ligado directamente a la degradación de compuestos carbonados por el metabolismo catalítico de los microorganismos. En este caso particular, las bacterias que conformaron el consorcio microbiano mostraron un crecimiento constante, sin variaciones significativas, es decir, la concentración inicial del inóculo empleado, en cada ensayo, a los 15 días de tratamiento no se vio afectada, lo que indica la generación y muerte constante de células bacterianas. Esto se explica debido a la complejidad y el alto requerimiento energético que se necesita para metabolizar fuentes carbonadas y convertirlas en moléculas metabólicamente activas para su degradación, como es el caso de los hidrocarburos de petróleo (Abbasian et al., 2015). Lo mencionada se ve reflejado en los resultados obtenidos con el control positivo y prueba, los cuales, al haberse agregada un biotensioactivo, facilita la degradación de los compuestos en mención. Sin embargo, se requiere aún más tiempo para completar la degradación completa. Los valores obtenidos a los 15 días de tratamiento coinciden con lo reportado por Ángeles & Refugio (2013), quienes reportaron concentraciones máximas de aerobios mesófilos de 5.6×10^8 UFC/g en un tratamiento bioaumentado de 10 días, la cual se mantuvo constante a lo largo del ensayo.

Excepcionalmente, el control abiótico, tal como se observa en la figura 9, evidenció un aumento significativo de la población microbiana desde el día 0 al día 15, debido a que, a pesar del trabajo en condiciones estériles para la manipulación de las muestras y los microcosmos de ensayo, no se puede excluir el hecho de una posible introducción de microorganismos externos hacia los sistemas, así como también la reactivación de la microbiota del suelo que fue sometida a esterilización por radiación, previo a los tratamientos de remediación. Estos resultados son reflejados de manera similar en la tesis de Bocángel (2016), en la cual se evidenció un incremento de los microorganismos en el control abiótico a lo largo del tiempo, por lo que se podría considerar un fenómeno normal.

De esto se puede concluir que en un proceso de degradación in situ, puede existir participación de un microbiota externo que influya en el proceso de biorremediación, ya sea como microorganismos simbióticos, los cuales pueden producir ramnolípidos u otro tipo de biosurfactantes in situ o como antagonistas.

Si comparamos los resultados obtenidos entre el ensayo de prueba y el control negativo, podemos afirmar que existe una mejora notable en el proceso de degradación de HTP cuando se adiciona ramnolípido al tratamiento de remediación biológica, tal como se evidencia en la figura 11. Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos por Bocángel (2016) quien logró reducir un total de 0.154 g de HTP/500 g de suelo a los 30 días de tratamiento, empleando un consorcio microbiano psicotolerante con alta capacidad degradativa, ya que solo logró reducir el 1.780% de lo que redujo nuestro ensayo al incorporar biosurfactantes, teniendo en cuenta que solo se realizó 15 días de tratamiento. En otro estudio realizado por (Rong et al., 2021), se emplearon diferentes tratamientos con surfactantes y biosurfactantes para la remediación de suelo contaminado con HTP, hecho por el cual lograron eliminar el 80.24% de HTP en 30 días de tratamiento. Este resultado supera lo obtenido en nuestro ensayo de prueba, sin embargo, cabe resaltar que el tiempo de tratamiento fue más prolongado, así como también, bioaumentaron el suelo con bacterias nativas con alta capacidad degradativa y que posiblemente presenten capacidad productora de biosurfactantes, lo cual fue contrario para nuestros ensayos. Otro factor importante para tomar en cuenta es que, la concentración media inicial de HTP que se empleó para nuestros ensayos, fue de 24.375 g/500 g de suelo, lo cual supera por mucho las concentraciones realizadas en otros ensayos de remediación.

Tomando en cuenta esto, se puede inferir que el biosurfactante ramnolípido producido por la cepa *P. aeruginosa* 6K-11 tiene la capacidad de reducir y a su vez acelerar el proceso de degradación de HTP cuando se emplea tratamientos de remediación biológica, sin embargo, es necesario optimizar la dosis adecuada de biosurfactante a emplear ya que si se aplica una dosis excesiva podría afectar la biodisponibilidad de los HTP siendo estos los que se degraden en primer orden (Harms, 2011), además, realizar un estudio utilizando un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo de forma natural, ya que es posible que al añadir ramnolípidos estos puedan activar y estimular microorganismos nativos repotenciando su capacidad degradativa, tal como lo reportó Rong et al. (2021). En este aspecto, es necesario a su vez, realizar un estudio de la variación del microbiota del suelo en un proceso de remediación in situ de HTP empleando biosurfactantes, para así conocer qué tipo de microorganismos tienen la capacidad de activarse y proliferar durante el tratamiento. Finalmente, es importante verificar las fracciones de hidrocarburos que son degradadas con mayor facilidad y cuáles son las que permanecen de manera recalcitrante en el suelo, tras haber recibido el tratamiento con biosurfactantes ramnolípido.

5 CONCLUSIONES

- La adición del biosurfactante ramnolipídico acelera y mejora el proceso de degradación de hidrocarburos totales de petróleo en el proceso de remediación biológica del suelo evaluado en un 34.62% con una degradación neta de 8.655 g de HTP.
- El ramnolípido empleado, producido por la cepa hiperproductora *P. aeruginosa* 6K-11, no presenta niveles de toxicidad a una concentración de 80 g/L para los microorganismos ensayados.
- Se diseñó un consorcio microbiano con capacidad hidrocarbonoclástica no productores de ramnolípidos con las cepas *P. aeruginosa* IT4B-3, *P. aeruginosa* 2K-1, *B. cepacia* 22b y *P. aeruginosa* 3K-6.

6 ANEXOS

Tabla A1 Valores del porcentaje de humedad tomados al inicio y al final del tratamiento de biorremediación durante 15 días

Muestra	%Humedad (0 días)	%Humedad (15 días)
Control abiótico	40.033	41.258
Control negativo	42.736	40.717
Prueba	42.912	39.594
Control positivo	47.380	41.107

Tabla A2 Valores del pH tomados al inicio y final del tratamiento de biorremediación durante 15 días

Muestra	pH (0 días)	pH (15 días)
Control abiótico	6.08	8.28
Control negativo	6.365	7.515
Prueba	6.295	8.145
Control positivo	6.425	8.34

Tabla A3 Valores de temperatura tomados al inicio y final del tratamiento de biorremediación durante 15 días

Muestra	T°C (0 días)	T°C (15 días)
Control abiótico	23	22.1
Control negativo	22.0	22.65
Prueba	23.2	22.65
Control positivo	22.5	22.7

Tabla A4 Valores del recuento de bacterias aerobias mesófilas tomados al inicio y final del tratamiento de biorremediación durante 15 días

Muestra	Ln (UFC/g) (0 días)	Ln (UFC/g) (15 días)
Control abiótico	0	18.210
Control negativo	18.988	19.054
Prueba	19.733	19.422
Control positivo	17.448	19.317

Tabla A5 Valores de la concentración de ramnolípidos tomados al inicio y final del tratamiento de biorremediación durante 15 días

Muestra	Ln (UFC/g) (0 días)	Ln (UFC/g) (15 días)
Control abiótico	63.011	84.861
Control negativo	44.088	57.8305
Prueba	64.296	69.554
Control positivo	104.1185	40.0465

Tabla A6 Crecimiento microbiano a concentraciones distintas de RI a los 0 días

Cepas	Biomasa g/L			
	0.8 g/L RL	80 g/L RL	Control -	Control +
<i>P. aeruginosa</i> IT4B-3	0.137	0.141	0.127	0.122
<i>P. aeruginosa</i> 2K-1	0.193	0.202	0.190	0.190
<i>B. cepacia</i> 22b	0.122	0.174	0.099	0.098
<i>P. aeruginosa</i> 3K-6	0.235	0.250	0.232	0.233

Tabla A7 Crecimiento microbiano a concentraciones distintas de RI a los 7 días

Cepas	Biomasa g/L			
	0.8 g/L RL	80 g/L RL	Control -	Control +
<i>P. aeruginosa</i> IT4B-3	0.135	0.150	0.142	0.150
<i>P. aeruginosa</i> 2K-1	0.199	0.226	0.200	0.247
<i>B. cepacia</i> 22b	0.112	0.235	0.106	0.177
<i>P. aeruginosa</i> 3K-6	0.234	0.262	0.239	0.248

Tabla A8 Crecimiento microbiano a concentraciones distintas de RI a los 14 días

Cepas	Biomasa g/L			
	0.8 g/L RL	80 g/L RL	Control -	Control +
<i>P. aeruginosa</i> IT4B-3	0.167	0.305	0.153	0.152
<i>P. aeruginosa</i> 2K-1	0.195	0.294	0.196	0.235
<i>B. cepacia</i> 22b	0.122	0.683	0.102	0.216
<i>P. aeruginosa</i> 3K-6	0.231	0.280	0.243	0.247

Tabla A9 Prueba de ANOVA de una sola vía de la reducción de los HTP a los 15 días de tratamiento

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	192.1	2	96.06	F (2, 3) = 1.762	P=0.3118
Residual (within columns)	163.6	3	54.52		
Total					

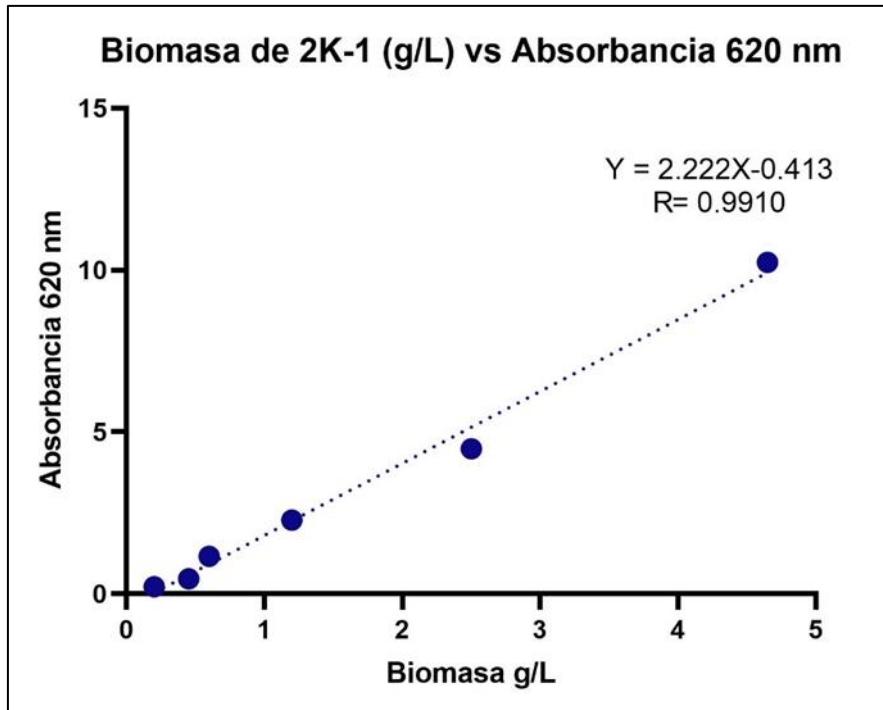


Figura A1 Curva de calibración de Biomasa en g/L vs Absorbancia a 620 nm para la cepa *P. aeruginosa* 2K-1 codificada como HSM-HC11

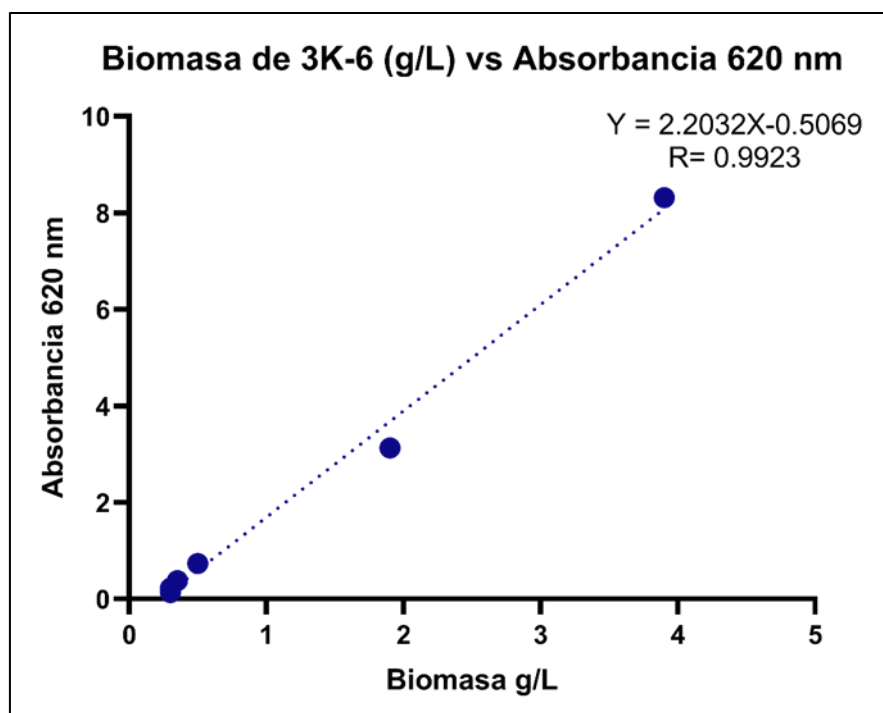


Figura A2 Curva de calibración de Biomasa en g/L vs Absorbancia a 620 nm para la cepa *P. aeruginosa* 3K-6 codificada como HSM-HC5

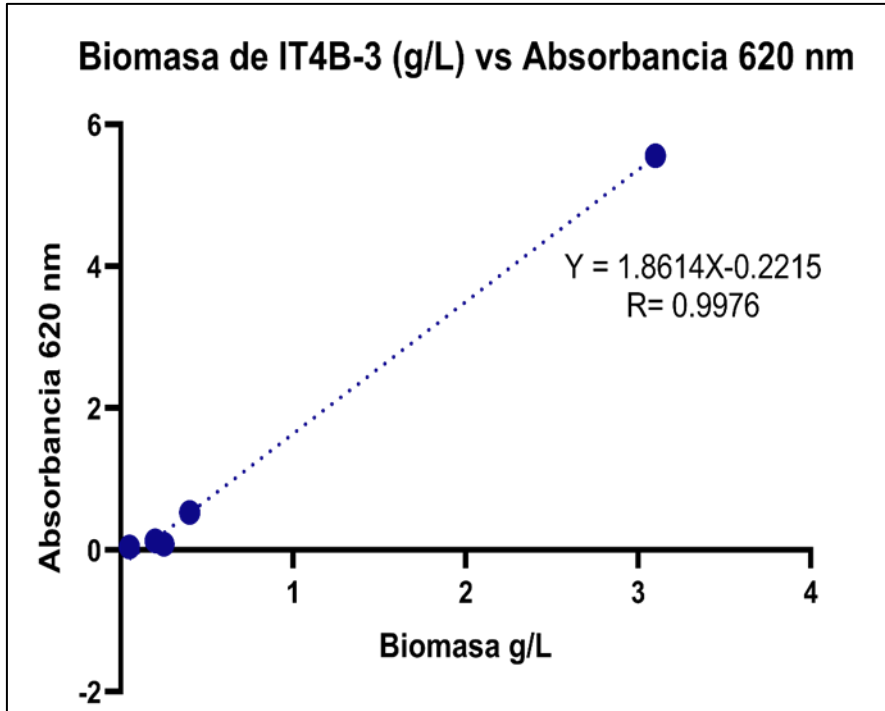


Figura A3 Curva de calibración de Biomasa en g/L vs Absorbancia a 620 nm para la cepa *P. aeruginosa* IT4B-3 codificada como HSM-HC7

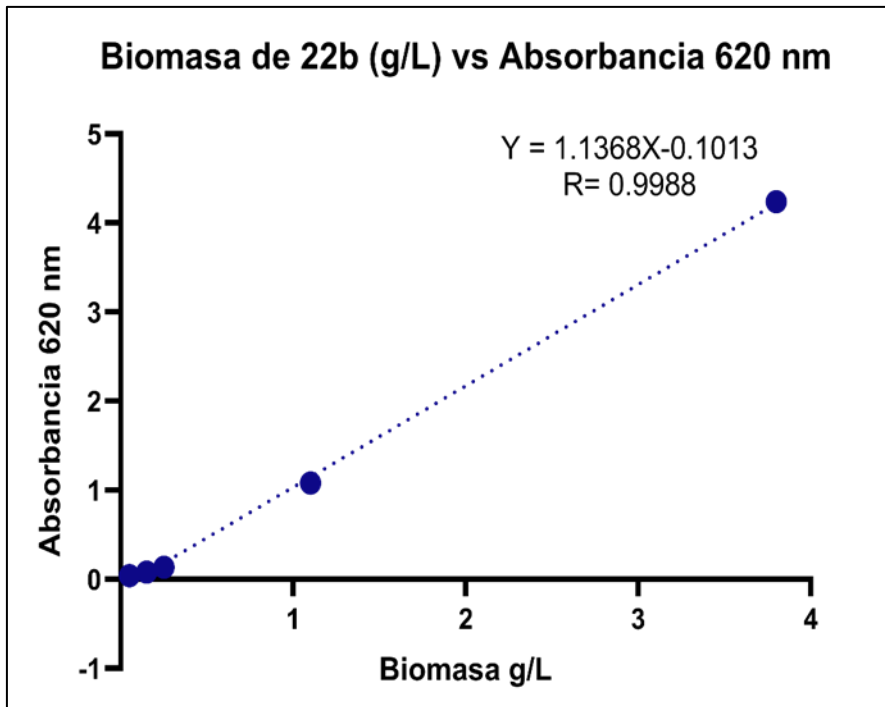


Figura A4 Curva de calibración de Biomasa en g/L vs Absorbancia a 620 nm para la cepa *B. cepacia* IT4B-3 codificada como HSM-HC13

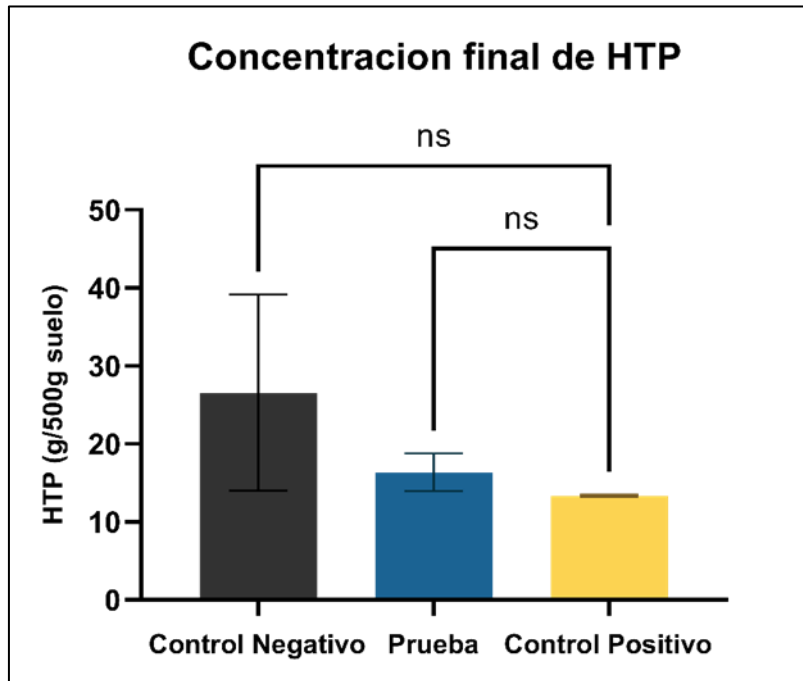


Figura A5 Grafica de reducción de HTP en 500 g de suelo a los 15 días de tratamiento con significancia y errores obtenida del análisis de ANOVA

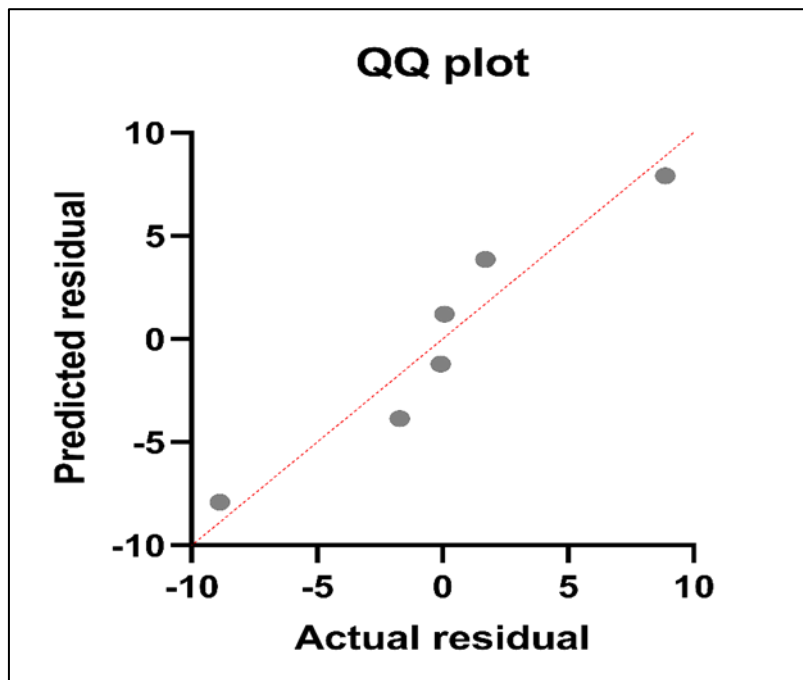


Figura A6 Grafica QQ plot obtenida del análisis de ANOVA

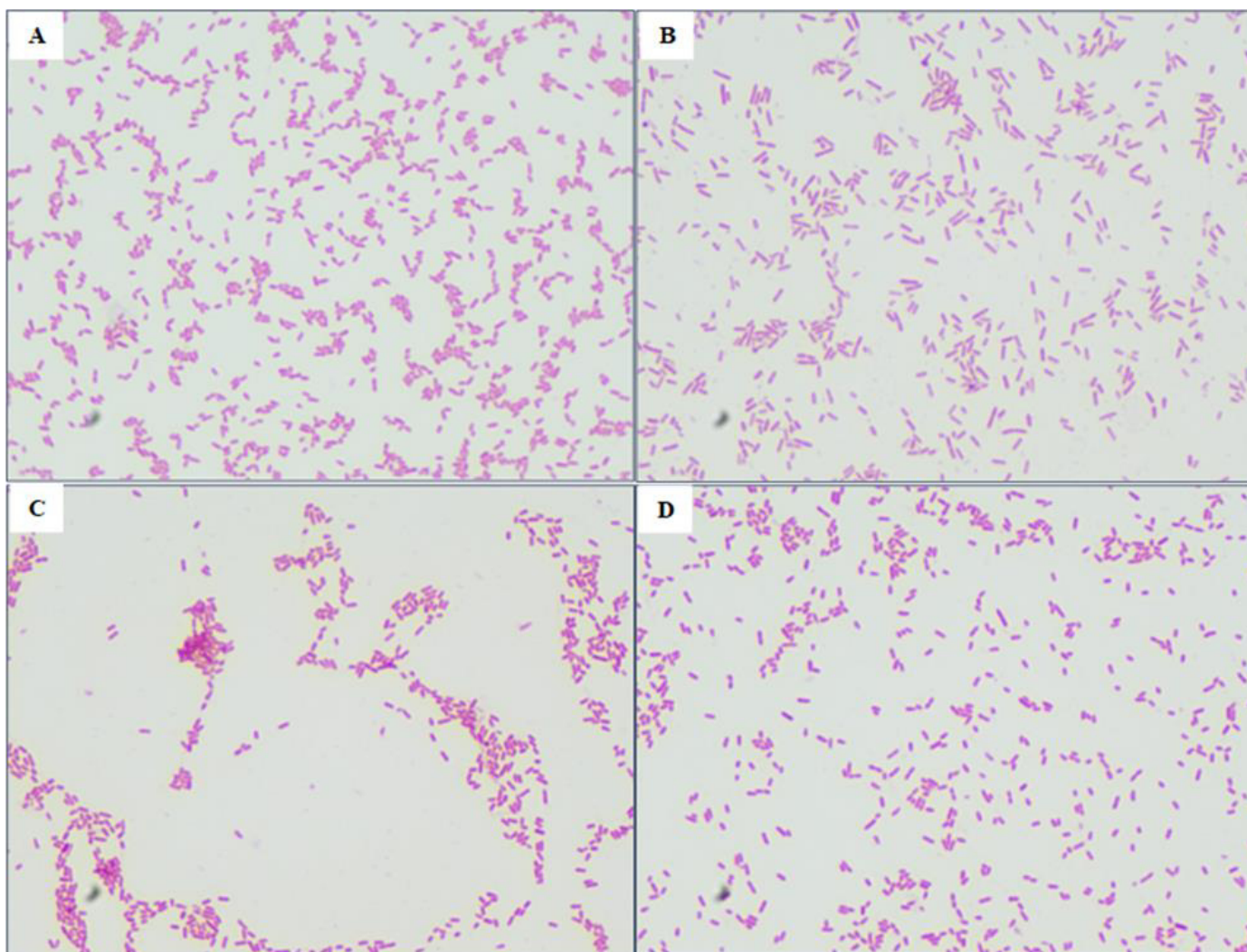


Figura A7 Morfología celular mediante tinción de gram de las bacterias conformadoras del consorcio con actividad hidrocarbonoclástica. A) *P. aeruginosa* 2K-1; B) *P. aeruginosa* 3K-6; C) *P. aeruginosa* IT4B-3; D) *B. cepacia* 22b

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., & Naidu, R. (2015). A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176(3), 670-699.

Ahmad, Zulfqar, et al. "Isolation, screening and functional characterization of biosurfactant producing bacteria isolated from crude oil contaminated site." *Int. J. Agric. Biol* 18.3 (2016): 542-548.

Alcalde, M. (2018). Influencia de las sales inorgánicas en la optimización de la producción de rhamnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 empleando la metodología de superficie de respuesta. Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Ángeles, M. T., & Refugio, R. V. (2013). In situ biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 595–605. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200040>

Arrieta, O., Rivera, A., Arias, L., Ruiz, O., & Cardona, S. (2012). Bioremediation of Soil with Diesel Through the Use of Autochthonous microorganisms. In *Revista Gestión y Ambiente* (Vol. 15, Issue 1). <https://revistas.unal.edu.co/index.php/gestion/article/view/30815/30926>.

Bao, J., Lv, Y., Liu, C., Li, S., Yin, Z., Yu, Y., & Zhu, L. (2022). Performance evaluation of rhamnolipids addition for the biodegradation and bioutilization of petroleum pollutants during the composting of organic wastes with waste heavy oil. *iScience*, 104403.

Bezza, F. A., & Nkhalambayausi-Chirwa, E. M. (2015). Desorption kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from contaminated soil and the effect of biosurfactant supplementation on the rapidly desorbing fractions. <http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tbeq>, 29(4), 680–688. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1028444>

Bocángel, C. del R. (2016). Evaluación de la eficacia de un consorcio bacteriano aislado en la base peruana "Machu Picchu"- Antártida en la bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, a nivel de terrarios. http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4804/1/Bocangel_rc.pdf

Brinch, U. C., Ekelund, F., & Jacobsen, C. S. (2002). Method for spiking soil samples with organic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1808–1816. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1808-1816.2002>

Chaprão, M. J., Ferreira, I. N., Correa, P. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Silva, E. J., & Sarubbo, L. A. (2015). Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 471-479.

Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., & Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. In *Biotechnology Advances* (Vol. 33, Issue 6, pp. 745–755). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003>

Cline, M. G. (1944). Principles Of Soil Sampling. *Soil Science*, 58(4). https://journals.lww.com/soilsci/Fulltext/1944/10000/PRINCIPLES_OF_SOIL_SAMPLING.3.aspx

Congiu, E., & Ortega-Calvo, J. J. (2014). Role of desorption kinetics in the rhamnolipid-enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*, 48(18), 10869–10877. <https://doi.org/10.1021/ES5011253>

Costa, A. S., Romão, L. P. C., Araújo, B. R., Lucas, S. C. O., Maciel, S. T. A., Wisniewski Jr, A., & Alexandre, M. D. R. (2012). Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresource Technology*, 105, 31-39.

Dopazo, C. P., Lemos, M. L., Lodeiros, C., Bolinches, J., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1988). Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology*, 65(2), 97–101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb01497.x>

EMBL-EBI. (2014, August 4). polysorbate 80 (CHEBI:53426). <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:53426>

Eras-Muñoz, E., Farré, A., Sánchez, A., Font, X., & Gea, T. (2022). Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. *Bioengineered*, 13(5), 12365-12391.

Escalante, R. M. (2002). Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios (Vol. 148).

Gaitán, D. M., & Perez, L. I. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*).

Farias, C. B. B., Almeida, F. C., Silva, I. A., Souza, T. C., Meira, H. M., Rita de Cássia, F., ... & Sarubbo, L. A. (2021). Production of green surfactants: Market prospects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 51, 28-39.

Gao, Y. Z., Ling, W. T., Zhu, L. Z., Zhao, B. W., & Zheng, Q. S. (2007). Surfactant-Enhanced Phytoremediation of Soils Contaminated with Hydrophobic Organic Contaminants: Potential and Assessment. *Pedosphere*, 17(4), 409–418. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(07\)60050-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(07)60050-2)

Harms, H. (2011). Bioavailability and Bioaccessibility as Key Factors in Bioremediation. In *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition (Vol. 6). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00367-6>

Helmy, Q., Laksmono, R., & Kardena, E. (2015). Bioremediation of aged petroleum oil contaminated soil: from laboratory scale to full scale application. *Procedia Chemistry*, 14, 326-333.

Henkel, M., Müller, M. M., Kügler, J. H., Lovaglio, R. B., Contiero, J., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2012). Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. In *Process Biochemistry* (Vol. 47, Issue 8, pp. 1207–1219). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.04.018>

Herrero, M. R. (2005). Balance de macronutrientes y materia orgánica en el suelo de agrosistemas hortícolas con manejo integrado y ecológico (Doctoral dissertation, Universitat de València)

Kanally, R. A., & Harayama, S. (2010). Advances in the field of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteriambt-130 136..164. In *Microbial Biotechnology* (Vol. 3, Issue 2, pp. 136–164). *Microb Biotechnol.* <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00130.x>

Kaplan, C. W., & Kitts, C. L. (2004). Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1777. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1777-1786.2004>

Koch, A. K., Kappeli, O., Fiechter, A., & Reiser, J. (1991). Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Journal of Bacteriology*, 173(13), 4212–4219. <https://doi.org/10.1128/jb.173.13.4212-4219.1991>

Liu, Y., Zeng, G., Zhong, H., Wang, Z., Liu, Z., Cheng, M., Liu, G., Yang, X., & Liu, S. (2017). Effect of rhamnolipid solubilization on hexadecane bioavailability: enhancement or reduction? *Journal of Hazardous Materials*, 322, 394–401. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.10.025>

Maia, M., Capão, A., & Procópio, L. (2019). Biosurfactant produced by oil-degrading *Pseudomonas putida* AM-b1 strain with potential for microbial enhanced oil recovery. *Bioremediation Journal*, 23(4), 302–310. <https://doi.org/10.1080/10889868.2019.1669527>.

Mnif, I., Sahnoun, R., Ellouz-Chaabouni, S., & Ghribi, D. (2017). Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 72-81.

Monsigny, M., Petit, C., & Roche, A. C. (1988). Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Analytical Biochemistry*, 175(2), 525–530. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90578-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90578-7)

Narvaez-Flores, S., L. Gomez, M., & Martinez, M. M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aislada de sedimentos del Caribe Colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*, 37, 61–75. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-97612008000100004&script=sci_abstract&tIng=es

Nguyen, T. T., Youssef, N. H., McInerney, M. J., & Sabatini, D. A. (2008). Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Research*, 42(6–7), 1735–1743. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.038>

Noordman, W. H., Ji, W., Brusseau, M. L., & Janssen, D. B. (1998). Effects of rhamnolipid biosurfactants on removal of phenanthrene from soil. *Environmental Science and Technology*, 32(12), 1806–1812. <https://doi.org/10.1021/es970739h>

Palomino, R. A. (2018). Caracterización molecular de genes asociados a la producción de ramnolípidos en microorganismos aislados de ambientes contaminados por petróleo en el Perú. In *Repositorio de Tesis - UNMSM. Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.

Pletnev, M. Y. (2001). Chemistry of surfactants. *Studies in Interface Science*, 13(C), 1–97. [https://doi.org/10.1016/S1383-7303\(01\)80062-4](https://doi.org/10.1016/S1383-7303(01)80062-4)

Rehman, R., Ali, M. I., Ali, N., Badshah, M., Iqbal, M., Jamal, A., & Huang, Z. (2021). Crude oil biodegradation potential of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Meyerozyma* sp. *Journal of Hazardous Materials*, 418, 126276. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.126276>

Rocha, C., & Infante, C. (1997). Enhanced oily sludge biodegradation by a tensio-active agent isolated from *Pseudomonas aeruginosa* USB-CS1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(5), 615–619. <https://doi.org/10.1007/s002530050983>

Rong, L., Zheng, X., Oba, B. T., Shen, C., Wang, X., Wang, H., Luo, Q., & Sun, L. (2021). Activating soil microbial community using bacillus and rhamnolipid to remediate TPH contaminated soil. *Chemosphere*, 275, 130062. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.130062>

Samanez Gibaja, E. (2008). Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo. In Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/245>

Schmugge, T. J., Jackson, T. J., & McKim, H. L. (1980). Survey of methods for soil moisture determination. *Water Resources Research*, 16(6), 961–979. <https://doi.org/10.1029/WR016i006p00961>

Schwab, A. P., Su, J., Wetzel, S., Pekarek, S., & Banks, M. K. (1999). Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environmental Science and Technology*, 33(11), 1940–1945. <https://doi.org/10.1021/es9809758>

Singh, R., & Rathore, D. (2019). Impact assessment of azulene and chromium on growth and metabolites of wheat and chilli cultivars under biosurfactant augmentation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 186, 109789.

Sun, S., Wang, Y., Zang, T., Wei, J., Wu, H., Wei, C., ... & Li, F. (2019). A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresource technology*, 281, 421-428.

Tabuchi, T. R. (2014). Optimización del uso de agar con cetiltrimetilamonio bromuro y azul de metileno para la selección de cepas de *pseudomonas* spp . productoras de ramnolípidos.

Terán, P. G. (2020). Evaluación de la capacidad hidrocarbonoclástica de un consorcio formulado con bacterias aisladas de canchas de tratamiento de tierra contaminada con petróleo.

Trejos-Delgado, C., Cadavid-Restrepo, G. E., Hormaza-Anaguano, A., Agudelo, E. A., Barrios-Ziolo, L., Loaiza-Usuga, J. C., & Cardona-Gallo, S. A. (2020). Oil Bioremediation in a Tropical Contaminated Soil Using a Reactor. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 92(2), e20181396. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020181396>

Wang, Q., Fang, X., Bai, B., Liang, X., Shuler, P. J., Goddard, W. A., & Tang, Y. (2007). Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(4), 842–853. <https://doi.org/10.1002/bit.21462>

Wei, Z., Wang, J. J., Gaston, L. A., Li, J., Fultz, L. M., DeLaune, R. D., & Dodla, S. K. (2020). Remediation of crude oil-contaminated coastal marsh soil: Integrated effect of biochar, rhamnolipid biosurfactant and nitrogen application. *Journal of hazardous materials*, 396, 122595

Wolf, D. C., & Gan, J. (2018a). Influence of rhamnolipid biosurfactant and Brij-35 synthetic surfactant on 14C-Pyrene mineralization in soil. *Environmental Pollution*, 243, 1846–1853. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.031>

Wolf, D. C., & Gan, J. (2018b). Influence of rhamnolipid biosurfactant and Brij-35 synthetic surfactant on 14C-Pyrene mineralization in soil. *Environmental Pollution*, 243(Pt B), 1846–1853. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.031>

Youssef, N. H., Nguyen, T., Sabatini, D. A., & McInerney, M. J. (2007). Basis for formulating biosurfactant mixtures to achieve ultra low interfacial tension values against hydrocarbons. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(7), 497–507. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0221-9>

Zang, T., Wu, H., Yan, B., Zhang, Y., & Wei, C. (2021). Enhancement of PAHs biodegradation in biosurfactant/phenol system by increasing the bioavailability of PAHs. *Chemosphere*, 266, 128941

Zeng, G., Fu, H., Zhong, H., Yuan, X., Fu, M., Wang, W., & Huang, G. (2006). Co-degradation with glucose of four surfactants, CTAB, Triton X-100, SDS and Rhamnolipid, in liquid culture media and compost matrix. *Biodegradation* 2006 18:3, 18(3), 303–310. <https://doi.org/10.1007/S10532-006-9064-8>

Zhang, R., Wang, Y., Tan, L., Zhang, H. Y., & Yang, M. (2012). Analysis of Polysorbate 80 and its Related Compounds by RP-HPLC with ELSD and MS Detection. *Journal of Chromatographic Science*, 50(7), 598–607. <https://doi.org/10.1093/CHROMSCI/BMS035>

Zhang, X., Xu, D., Zhu, C., Lundaa, T., & Scherr, K. E. (2012). Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Chemical Engineering Journal*, 209, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.07.110>

Zhong, H., Liu, Y., Liu, Z., Jiang, Y., Tan, F., Zeng, G., Yuan, X., Yan, M., Niu, Q., & Liang, Y. (2014). Degradation of pseudo-solubilized and mass hexadecane by a *Pseudomonas aeruginosa* with treatment of rhamnolipid biosurfactant. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 94, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.07.012>