Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

Evaluación metabólica de *bacillus thuringiensis* y *pseudomonas aeruginosa* en un cultivo con petróleo crudo con y sin surfactantes

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga

AUTOR

Lizet Maura BANDAN CORTEZ

ASESORES

Tito Libio SÁNCHEZ ROJAS

Carlos Daniel PARIONA VELARDE (Coasesor)

Lima, Perú

2026



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

Bandan, L. (2026). *Evaluación metabólica de bacillus thuringiensis y pseudomonas aeruginosa en un cultivo con petróleo crudo con y sin surfactantes*. [Tesis de pregrado, 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	Lizet Maura Bandan Cortez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71324478
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5076-5883
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Tito Libio Sánchez Rojas
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08550935
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3853-2128
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Carlos Daniel Pariona Velarde
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	44053500
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3927-2874
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Susana Mónica Gutiérrez Moreno
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08060631
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Fernando Abilio Merino Rafael
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08038358
Miembro del jurado 2	

Nombres y apellidos	Roger Alberto Palomino Huarcaya
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25841842
Datos de investigación	
Línea de investigación	No aplica.
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y el Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (PROCIENCIA). Concurso E073-2023- 01- Tesis de Pregrado y Postgrado en Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica". PE5010855262023. Perú. Instituto Tecnológico de la Producción (ITP). Dirección de Investigación, Desarrollo, Innovación y Transferencia Tecnológica (DIDITT).
Ubicación geográfica de la investigación	Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) País: Perú Departamento: Lima Provincia: Callao Distrito: Ventanilla Dirección/Calle: Carretera a Ventanilla Km. 5.2 Centro Poblado / Urbanización: Sector Pampas de Ventanilla (zona industrial/ExITP Pesquero) Latitud: -11.98938 Longitud: -77.12764
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2024 – 2025
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Biotecnología ambiental https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.08.01

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

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA

(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DE TESIS)

Siendo las 14:06 horas del 11 de setiembre del 2026, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **LIZET MAURA BANDAN CORTEZ.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N.° **UNMSM-20250142084,** la titulando expuso su tesis: **EVALUACIÓN METABÓLICA DE *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa* EN UN CULTIVO CON PETRÓLEO CRUDO CON Y SIN SURFACTANTES**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18 calificado: Aprobado con mención honrosa.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **LIZET MAURA BANDAN CORTEZ** y se eleva lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título conforme a ley.

Siendo las 15:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 11 de setiembre de 2026.

SUSANA MONICA GUTIERREZ MORENO
PRESIDENTA

TITO LIBIO SANCHEZ ROJAS
ASESOR

ROGER ALBERTO PALOMINO HUARCAYA
MIEMBRO

FERNANDO ABILIO MERINO RAFAEL
MIEMBRO

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

Anexo 1

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, TITO LIBIO SANCHEZ ROJAS, en mi condición de asesor acreditado mediante Dictamen de la EP N° 000003-2026-EPMP-FCB/UNMSM de la tesis, cuyo título es "Evaluación metabólica de *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa* en un cultivo con petróleo crudo con y sin surfactantes", presentado por la bachiller LIZET MAURA BANDAN CORTEZ para optar al Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 2 % de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga.

Lima, 06 de octubre de 2026

Firma del Asesor:

UNMSM
Firmado digitalmente por SANCHEZ ROJAS Tito Libio FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 06.10.2026 15:24:36 -05:00

Nombres y Apellidos del asesor: Tito Libio Sánchez Rojas
DNI: 08550935

AGRADECIMIENTO

Se agradece al Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) por brindarme sus cepas y sus ambientes para el desarrollo de este trabajo de tesis. Así también, a los trabajadores del laboratorio de Fisicoquímica, Microbiología y Biotecnología.

Se agradece al Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña, docente de la Universidad Ricardo Palma y a la bióloga Claudia De los Ríos Silva por brindar sus cepas.

Se agradece a la empresa Repsol, por la donación de dos galones de petróleo crudo para el desarrollo de la tesis.

A mis asesores, al Dr. Tito Sánchez y al MSc. Carlos Pariona, por su confianza y su disposición constante al diálogo. Agradezco su tiempo, paciencia y apertura para el intercambio de ideas.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y el Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (PROCIENCIA) en el marco del Concurso E073-2023-01- Tesis de Pregrado y Postgrado en Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica"
Número de contrato PE501085526-2023.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL 2
ÍNDICE DE FIGURAS 4
RESUMEN 6
ABSTRACT 7
I. INTRODUCCIÓN 8
II. MARCO TEÓRICO 9
2.1. El petróleo y el subsector hidrocarburos en el Perú 9
2.1.2. Origen y composición del petróleo 9
2.1.2. Toxicidad del petróleo 9
2.2. Biorremediación de hidrocarburos de petróleo 10
2.2.2. Cepas microbianas que degradan hidrocarburos 10
2.2.3. Surfactantes 11
2.3. Indicadores metabólicos en sistemas bacteria-petróleo 12
2.4. Técnicas de evaluación de hidrocarburos de petróleo 13
2.4.2. Gravimetría 14
2.4.3. Espectroscopia infrarroja por Transformado de Fourier (FTIR) 14
III. HIPÓTESIS 15
IV. OBJETIVOS 15
4.1. Objetivo general 15
4.1. Objetivos específicos 15
V. MATERIALES Y MÉTODOS 16
5.1. Cepas bacterianas 16
5.2. Diseño de evaluación 17
5.3. Evaluación metabólica de las bacterias 19
5.3.1. Evaluación de las actividades enzimática 19
5.3.2. Evaluación del crecimiento microbiano 20
5.3.3. Evaluación de proteína soluble 21
5.4. Evaluación fisicoquímica del sistema 22
5.5. Evaluación del petróleo emulsionado por FT IR 22
5.6. Análisis e interpretación de datos 23
VI. RESULTADOS 23
6.1. Evaluación metabólica de las bacterias 23
6.2. Evaluación física del sistema 30
6.3. Evaluación del petróleo por FT IR 38
VII. DISCUSIÓN 42
7.1. Evaluación metabólica de la interacción bacteria-petróleo 42
7.2. Evaluación física de la interacción bacteria-petróleo 45

7.3. Evaluación del petróleo por FT IR 48
VIII. CONCLUSIONES 51
IX. RECOMENDACIONES 53
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54
XI. ANEXOS 65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva estándar de albúmina al 0.1 %.....21

Figura 2. Evaluación visual tras la sonicación 23

Figura 3. Cultivo microorganismos con petróleo a los 14 días de incubación. 24

Figura 4. Evaluación de las actividades enzimáticas.....25

Figura 5. Dendograma basado en distancias Euclidea 29

Figura 6. Evaluación visual de los consorcios a los 7 y 14 días de incubación.....36

Figura 7. Evaluación de los porcentajes de degradación y de emulsión.....37

Figura 8. Evaluación del petróleo crudo sin incubación 39

Figura 9. Evaluación de la fracción emulsionada.....40

Figura 10. Comparación de las curvas entre 2700-3200 cm 41

Figura 11. Comparación de interferogramas para la evaluación de degradación. 48

Figura 12. Comparación de interferogramas entre hidrocarburos de petróleo.....49

Figura 13. Comparación de interferogramas durante 8 semanas.....50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de aditivos para la mejora del comportamiento del consorcio.….18

Tabla 2. Sistema de evaluación de la actividad óxido-reductora 19

Tabla 3. Sistema de evaluación de la actividad lipolítica 19

Tabla 4. Sistema de evaluación de la actividad proteolítica 20

Tabla 5. Sistema para la preparación de la curva estándar 21

Tabla 6. Indicadores de selección del consorcio y de sus cepas conformantes 26

Tabla 7. Cuadro resumen de diferencias significativas y observaciones en los indicadores metabólicos. 27

Tabla 8. Evaluación de la reducción de petróleo y de la fracción emulsionada del consorcio seleccionado, de los controles y de las cepas de manera individual 36

RESUMEN

Se evaluó la respuesta metabólica inicial de *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa*, cepas no preadaptadas al petróleo y sin capacidad hidrocarburoclástica confirmada, en cultivos con petróleo crudo como única fuente de carbono, con y sin adición de surfactantes (*Allium cepa*, Tween 80 y sonicado de *P. aeruginosa*). El objetivo fue caracterizar la respuesta metabólica general de estas bacterias y los cambios fisicoquímicos del sistema. Se analizaron cultivos individuales y en consorcio, evaluándose indicadores metabólicos generales (actividad redox, lipolítica, proteolítica, crecimiento y concentración de proteína soluble) y parámetros fisicoquímicos del petróleo (gravimetría, emulsificación y FTIR-ATR).

Los resultados mostraron que, aun sin preadaptación, *P. aeruginosa* presentó alta actividad lipolítica (>100 %) y alta actividad redox (>50 %), mientras que *B. thuringiensis* presentó actividades significativamente menores, siendo la redox la más elevada pero inferior al 50 %. Esto evidencia que las bacterias desarrollan respuestas metabólicas iniciales asociadas a estrés y adaptación temprana, sin implicar degradación directa de hidrocarburos. Además, la adición de surfactantes (*Allium cepa* y Tween 80) incrementó la actividad proteolítica, mientras que la actividad lipolítica máxima se observó únicamente en presencia de *P. aeruginosa*, indicando que esta actividad depende principalmente de la cepa y no del estímulo externo.

Por último, a nivel fisicoquímico, los tratamientos con surfactantes y *P. aeruginosa* promovieron mayor emulsificación, redistribución de fases y cambios cualitativos detectables en FTIR, sin evidencia de degradación significativa del petróleo.

En conjunto, estos resultados confirman que la adición de surfactantes modula la respuesta metabólica general y el comportamiento físico del petróleo, aunque se resalta que la actividad lipolítica depende de la actividad intrínseca de *P. aeruginosa*. Los hallazgos aportan información relevante sobre la respuesta metabólica inicial de bacterias no adaptadas, útil para el diseño de estrategias de estimulación en escenarios de derrame.

Palabras clave: Petróleo crudo, respuesta metabólica, surfactantes, interacción bacteria-hidrocarburo.

ABSTRACT

The initial metabolic response of *Bacillus thuringiensis* and *Pseudomonas aeruginosa*, strains not preadapted to petroleum and without confirmed hydrocarbonoclastic capacity, was evaluated in cultures with crude oil as the sole carbon source, with and without the addition of surfactants (*Allium cepa*, Tween 80, and sonicated *P. aeruginosa*). The aim was to characterize the general metabolic response of these bacteria and the physicochemical changes in the system. Both individual and consortium cultures were analyzed, assessing general metabolic indicators (redox, lipolytic, and proteolytic activities, growth, and soluble protein concentration) and physicochemical parameters of crude oil (gravimetry, emulsification, and FTIR-ATR).

Results showed that, even without preadaptation, *P. aeruginosa* exhibited high lipolytic activity (>100 %) and high redox activity (>50 %), whereas *B. thuringiensis* showed significantly lower activities, with redox being the highest but below 50 %. These findings indicate that the bacteria develop initial metabolic responses associated with stress and early adaptation, without implying direct hydrocarbon degradation. Furthermore, the addition of surfactants (*Allium cepa* and Tween 80) increased proteolytic activity, while maximum lipolytic activity was observed only in the presence of *P. aeruginosa*, indicating that this activity depends primarily on the strain itself rather than on the external stimulus.

At the physicochemical level, treatments with surfactants and *P. aeruginosa* promoted greater emulsification, phase redistribution, and qualitative changes detectable by FTIR, without evidence of significant crude oil degradation.

Overall, these results confirm that the addition of surfactants modulates the general metabolic response and the physical behavior of crude oil, although lipolytic activity is primarily determined by the intrinsic activity of *P. aeruginosa*. These findings provide relevant information on the initial metabolic response of non-adapted bacteria, useful for designing stimulation strategies in oil spill scenarios.

Keywords: Crude oil; metabolic response; surfactants; bacteria–hydrocarbon interaction.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, la actividad petrolera ha generado numerosos derrames y pasivos ambientales, especialmente en regiones ecológicamente sensibles como la Amazonía (Ministerio de Energía y Minas, 2022; León & Zúñiga, 2020), cuyos efectos generan consecuencias ambientales y riesgos para la salud humana (ATSDR, 2016), pudiendo alterar procesos biogeoquímicos, afectar la biodiversidad y producir efectos adversos en poblaciones expuestas (Plitt, 2010).

Frente a esta problemática, la biorremediación microbiana se ha propuesto como una alternativa viable. Su aplicación, en sistemas controlados como microcosmos o mesocosmos (Nápoles et al., 2005; Ñústez et al., 2014), ha demostrado que ciertos microorganismos previamente adaptados, al haber sido aislados de ambientes contaminados, pueden transformar compuestos hidrocarbonados en productos menos contaminantes.

En particular, se ha reconocido que el uso de consorcios bacterianos, en lugar de cultivos puros, permite una interacción sinérgica que mejora la eficiencia del proceso de degradación (Surajit Das, 2014). Sin embargo, en escenarios reales como los derrames repentinos de petróleo, no es esperable la presencia inmediata de microorganismos adaptados al contaminante, ya que los procesos de adaptación requieren tiempo y eventos de selección. Por ello, resulta relevante estudiar la respuesta inicial de bacterias no adaptadas frente a hidrocarburos, bajo condiciones que simulen posibles estrategias de estimulación, como el empleo de emulsionantes o la conformación de consorcios bacterianos.

En ese contexto, indicadores metabólicos generales como la actividad redox, lipolítica, proteolítica, el crecimiento bacteriano y la concentración de proteína soluble pueden constituir herramientas útiles para caracterizar la respuesta inicial de los microorganismos frente a hidrocarburos, ya que permiten describir cambios fisiológicos asociados al estrés, la adaptación temprana y la activación de rutas metabólicas iniciales. Complementariamente, la cuantificación gravimétrica permite evaluar la posible degradación del petróleo tras la interacción con los tratamientos bacterianos, así como los cambios en su distribución o emulsificación.

Finalmente, empleando bacterias ubicuas no preadaptadas al petróleo crudo (*Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa*), se evaluó su respuesta metabólica general e inespecífica —actividad redox, lipolítica y proteolítica— y los cambios fisicoquímicos cualitativos del sistema en cultivos donde el petróleo crudo se incorporó como única fuente de carbono con y sin adición de surfactantes.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. El petróleo y el subsector hidrocarburos en el Perú

La actividad hidrocarburífera representa un eje importante para el desarrollo económico y energético del Perú, tanto por su aporte a la industria petroquímica como por los ingresos generados a través del canon y sobrecanon para gobiernos regionales y locales. Este subsector abarca procesos de exploración, extracción, transporte, refinación y comercialización de hidrocarburos en sus distintas formas: líquida (petróleo y condensados), gaseosa (gas natural) y sólida (hidratos de metano) (Gob.pe, 2021).

No obstante, su desarrollo ha estado acompañado de serias implicancias ambientales. Según León y Zúñiga (2022), entre 1997 y 2021 se reportaron más de 1000 derrames de hidrocarburos, siendo las empresas operadoras responsables en más del 70 % de los casos. Además, se identificaron 3231 pasivos ambientales —61 de alto riesgo para la salud y 35 para el ambiente—, con Loreto y Piura como las regiones más afectadas.

2.1.2. Origen y composición del petróleo

El petróleo es una mezcla de hidrocarburos, formado tras millones de años por la acumulación de restos orgánicos sometidos a distintos procesos fisicoquímicos, principalmente presión y temperatura; que resultan en una diversidad de compuestos (Herrera, 2020); cuyas características les permiten ser disgregados y aprovechados, en un proceso de destilación en el refinamiento del petróleo, produciendo a partir de él distintos derivados, cuyo valor agregado es mayor.

Esta diversidad en composición puede reflejarse en el color y olor del petróleo y evaluarse esencialmente por su punto de ebullición, su densidad (gravedad específica o grados API) y su viscosidad; y es debida a las condiciones y lugar de formación; por lo que, se dice que el petróleo es sitio-específico. Pudiendo ser clasificado como liviano o pesado por sus componentes con bajo punto de ebullición y moléculas cerosas, en el primer caso; mientras que el petróleo pesado por sus mayores proporciones de compuestos con mayor punto de ebullición, más aromáticos y que contienen heteroátomos metales (Speight, 2002).

2.1.2. Toxicidad del petróleo

La toxicidad de los hidrocarburos depende del tipo de compuesto, la dosis y la vía de exposición (Curtis et al., 2023). En ambientes acuáticos su biodisponibilidad es mayor que en suelos, lo que incrementa su impacto ecológico; pueden formar películas superficiales que disminuyen la penetración de luz y afectan procesos como la fotosíntesis y la productividad primaria, especialmente en zonas costeras de alta biodiversidad (Plitt, 2010).

En suelos, aunque la transferencia de masa es más limitada, los hidrocarburos pueden modificar la estructura y fertilidad, en especial cuando predominan fracciones meteorizadas (Adams et al., 2008). Estos compuestos también pueden afectar

comunidades microbianas autóctonas y procesos biogeoquímicos, influyendo en su propia biodegradación. La persistencia del contaminante depende de fenómenos como evaporación, absorción o aplicación de dispersantes, sin garantizar una remediación completa en todos los niveles (Owens Coastal Consultants, 2013).
En cuanto a la salud humana, los hidrocarburos pueden ingresar por inhalación, ingestión o contacto dérmico, generando efectos que van desde irritación y cefalea hasta daños crónicos; algunos compuestos, como el benceno y el benzopireno, son considerados cancerígenos (ATSDR, 2016).

2.2. Biorremediación de hidrocarburos de petróleo

La biorremediación es una alternativa ecológica para la recuperación de ambientes contaminados, basada en el uso de microorganismos capaces de transformar o reducir la toxicidad de compuestos peligrosos como los hidrocarburos del petróleo. Esta transformación se logra mediante procesos metabólicos que aprovechan al contaminante como fuente de carbono o energía (Surajit Das, 2014).
Existen distintas estrategias de biorremediación, clasificadas como *in situ* —cuando se aplican directamente en el sitio contaminado— o *ex situ*, cuando se trasladan a un sistema controlado. Las variantes *in situ* incluyen la bioatenuación (proceso natural), la bioestimulación (modificación de condiciones nutricionales para potenciar la actividad microbiana) y la bioaumentación (incorporación de microorganismos externos). Esta última presenta retos importantes, ya que las bacterias añadidas deben estar preadaptadas y ser compatibles con la microbiota local (Al-Kaabi et al., 2022).
Para la aplicación efectiva de biorremediación, deben considerarse factores ambientales (pH, temperatura, nutrientes, oxigenación), características del sitio y del propio contaminante. En este sentido, la presencia de hidrocarburos puede afectar la viabilidad de los microorganismos debido a su toxicidad o baja biodisponibilidad (Ravi et al., 2022).

2.2.2. Cepas microbianas que degradan hidrocarburos

Diversos estudios han documentado la capacidad de ciertas bacterias para interactuar con hidrocarburos del petróleo, en su mayoría a partir aislados de ambientes contaminados. La evaluación de esta interacción ha sido realizada tanto de forma cualitativa e inicial, por crecimiento en medios con hidrocarburo; como cuantitativa y más avanzada, mediante la detección de genes asociados a rutas degradativas (Makut & Ishaya, 2010; Kostka et al., 2011; Jiang et al., 2016).

Entre los géneros comúnmente reportados por su asociación con hidrocarburos se encuentran *Pseudomonas, Bacillus, Acinetobacter, Rhodococcus, Arthrobacter, Micrococcus y Alcanivorax* (García-Cruz & Aguirre-Macedo, 2014). Estos microorganismos pueden participar en diferentes etapas del proceso de degradación con el contaminante, desde fracciones ligeras hasta compuestos más complejos o recalcitrantes, como los hidrocarburos poliaromáticos (Kostka et al., 2011; Peralta et al., 2021).

Se destacan los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* por su ubicuidad y versatilidad metabólica. *Bacillus* por presentar la capacidad de formar esporas, lo que le confiere resistencia y supervivencia en condiciones ambientales extremas, además de encontrarse con frecuencia como microorganismo endógeno en suelos contaminados con petróleo (Ozyurek & Bilkay, 2017), en particular *Bacillus thuringiensis* que ha sido reportada como alternativas prometedoras para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos, evidenciándose reducciones en la demanda bioquímica de oxígeno y aumento de biomasa (Patiño et al., 2021), así como capacidad de degradar antraceno (Tarafdar et al., 2017). También se ha descrito la producción de biosurfactantes utilizando petróleo crudo, logrando en consorcio una degradación aproximada del 75 % del hidrocarburo (Bajelani et al., 2023) y, de manera aislada, una eficiencia de 55,82 % para fenantreno (Ranjbar & Mohammadzadeh, 2025).

Pseudomonas, y especialmente *Pseudomonas aeruginosa*, ampliamente reportada por su capacidad de interactuar con hidrocarburos del petróleo, tanto por su crecimiento en estos sustratos como por la producción de biosurfactantes como los ramnolípidos. Estas moléculas aumentan la biodisponibilidad del hidrocarburo mediante emulsificación, favoreciendo su absorción y posible transformación (Zhang et al., 2005). Además, esta especie produce diversas enzimas relacionadas con rutas oxidativas, como aldehído deshidrogenasa y lipasas, vinculadas con su actividad metabólica frente a compuestos oleosos (Heydeman & Azoulay, 1963).

Sin embargo, la sola presencia de estos géneros/especies no garantiza una degradación efectiva, ya que esta depende de múltiples factores abióticos que condicionan la interacción microbiana con el contaminante y pueden limitar su potencial real (Periche & Robles, 2016). Variables como la concentración y solubilidad del hidrocarburo, el pH, la disponibilidad de nutrientes y, especialmente, la temperatura influye directamente en la bioactividad microbiana. Por ejemplo, se ha reportado que las tasas de interacción o transformación tienden a disminuir a temperaturas bajas, debido a su efecto sobre la viscosidad y biodisponibilidad del compuesto (Das & Chandranya, 2011).

2.2.3. Surfactantes

Los surfactantes son moléculas anfipáticas, los cuales pueden ser clasificados en natural y químico según su origen, pero diferenciándose principalmente por su pureza, concentración micelar crítica y degradabilidad (Thakur et al., 2020). Siendo esta última, la razón por la cual en procesos de biorremediación de lugares contaminados con hidrocarburos de petróleo se prefiere usar surfactantes naturales, en especial los de origen microbiano como los ramnolípidos o lipopéptidos (Eras-Muñoz et al., 2022). La aplicación de biosurfactantes puede clasificarse dentro de la estrategia de bioestimulación (Faccioli et al., 2024); siendo está definida por la adición de materiales estimulantes, agentes de carga, nutrientes, biosurfactantes, biopolímeros o biofertilzantes para facilitar el crecimiento de microorganismos degradadores (Patiño et al., 2021).

2.3. Indicadores metabólicos en sistemas bacteria-petróleo

La interacción de bacterias con hidrocarburos de petróleo está determinada por múltiples factores estructurales del contaminante (como el número de carbonos, la presencia de anillos aromáticos y grupos funcionales), así como por las condiciones ambientales del entorno. Si bien algunos microorganismos poseen rutas metabólicas específicas para la transformación de hidrocarburos, en muchos casos la primera exposición al petróleo induce principalmente respuestas de metabolismo bacteriano general, proveniente del estrés fisiológico.

En cuanto, a microorganismos adaptados y con la capacidad de degradar hidrocarburos, a nivel aeróbico, los procesos de transformación de hidrocarburos suelen implicar reacciones de oxidación catalizadas por oxigenasas y deshidrogenasas, que convierten las moléculas en intermediarios asimilables. Estas enzimas han sido ampliamente reportadas en géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus* y *Burkholderia* (Chakraborty et al., 2014; Tirado-Torres et al., 2015; Ossai et al., 2020). Por ejemplo, en *P. aeruginosa* se ha descrito la acción del alcohol deshidrogenasa en la transformación de parafinas (Van Der Linden & Van Ravenswaay Claasen, 1971).

Adicionalmente, la presencia de genes asociados a estas rutas metabólicas, tanto en el cromosoma como en plásmidos catabólicos, refuerza la relación entre ciertas bacterias y la respuesta metabólica frente a hidrocarburos (Chauhan et al., 2008). Si bien algunas investigaciones predicen estos perfiles mediante herramientas bioinformáticas como Tax4Fun (Xue et al., 2020), en estudios experimentales como el presente, se opta por la evaluación de indicadores bioquímicos y fisicoquímicos.

2.3.2. Actividad óxidoreductora

Las oxidorreductasas son enzimas que catalizan el movimiento de electrones de una molécula donadora (reductora) a una aceptora (oxidante); por lo que, las reacciones óxido-reducción (redox) se pueden usar para evaluar la capacidad global de transferencia electrónica. Sin embargo, también se pueden aplicar en contexto de evaluar la capacidad de degradar hidrocarburos; ya que son fundamentales en las primeras etapas del metabolismo microbiano de hidrocarburos. Enzimas como monooxigenasas, deshidrogenasas y peroxidasas participan en estas rutas, muchas veces actuando sobre compuestos alifáticos o aromáticos simples (Wang et al., 2022).

En este contexto, la actividad óxidoreductora puede ser evaluada mediante indicadores colorimétricos como el 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP). Esta técnica ha sido utilizada en estudios como los de Ime et al. (2018) y Habib et al. (2017), ya sea de forma cuantitativa (por espectrofotometría) o cualitativa (por cambio de coloración). Otros indicadores incluyen remazol (Aranzales, 2021) y siringaldazina (Naeim et al., 2020), especialmente en estudios con compuestos aromáticos.

2.3.3. Actividad lipolítica

La actividad lipolítica constituye un indicador de metabolismo bacteriano, asociado

principalmente a la hidrólisis de triglicéridos y otros lípidos biológicos. Enzimas cuyas síntesis es influenciada por factores ambientales de interacción con sustratos o cofactores (Jaeger et al., 1994). El petróleo crudo, sin embargo, está compuesto mayoritariamente por alcanos y compuestos aromáticos no glicerídicos, por lo que su transformación no depende directamente de la acción de lipasas (Snellman & Colwell, 2004). En este contexto, la actividad lipolítica no debe interpretarse como un marcador específico de metabolismo del petróleo, sino como una manifestación inespecífica de adaptación celular o estrés fisiológico; sin embargo, su relevancia en degradación de hidrocarburos radica en que están implicadas en la β-oxidación y en la transformación de fracciones oleosas, especialmente aquellas presentes en hidrocarburos (Abubakar et al., 2024). Esta relación con potencial o capacidad de degradar hidrocarburos se ha realizado en medios sólidos —mediante formación de halo en placas con yema de huevo (Daniele et al., 2010)— o líquidos, utilizando sustratos cromogénicos como p-nitrofenilpalmitato o p-nitrofenolbutirato, cuyo producto se mide espectrofotométricamente (Pedroza-Padilla et al., 2017; Cervantes-Gonzáles et al., 2013). Además, se ha descrito, que lipasas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* expuesta a petróleo crudo muestran una actividad correlacionada con la remoción del contaminante (Abubakar et al., 2024); no obstante, dicha correlación no implica necesariamente que la lipasa actúe directamente sobre los hidrocarburos del petróleo.

2.3.4. Actividad proteolítica

Las proteasas son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos y participan en procesos de recambio proteico, regulación celular y obtención de nutrientes a partir de sustratos proteicos; consideradas enzimas principales de origen microbiano (Goncalves & Harumi, 2018). En este sentido, la actividad proteolítica no constituye un indicador específico de degradación de petróleo, ya que los hidrocarburos no poseen enlaces peptídicos y no son sustratos para proteasas; su incremento suele reflejar ajustes fisiológicos, daño celular o necesidad de movilizar reservas proteicas. Como también, un indicador útil de metabolismo activo. Bacterias como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Micrococcus* son conocidas por su capacidad proteolítica (Osman, 2022).

La actividad se evalúa generalmente mediante la formación de halos en medios con leche o caseína (Sánchez et al., 2004; Afrin et al., 2024), o bien mediante métodos espectrofotométricos usando azocaseína en cultivos líquidos.

2.3.5. Crecimiento microbiano

El crecimiento bacteriano refleja la eficiencia con la que un microorganismo utiliza un sustrato. Este enfoque ha sido común en estudios donde se relaciona el aumento de biomasa con la capacidad de interacción con hidrocarburos (Patowary et al., 2016; Mukherjee & Bordoloi, 2012; Bekele et al., 2022).

2.4. Técnicas de evaluación de hidrocarburos de petróleo

La evaluación de hidrocarburos, se ha enfocado principalmente en evaluar la degradación, también conocida como selección secundaria, se ha realizado principalmente por técnicas cromatográficas y/o gravimétricas (Syuhadah y Raikhan

2022), haciendo uso de solventes para su extracción y sales para quitar la humedad; sin embargo, también se ha realizado mediante técnicas espectrofotométricas tal como Obire (2001) usando tolueno a 420 nm o tal como Ibrahim (2016) usando hexano a 272 nm (espectrómetro UV–Vis).
Aunque también existen otras maneras, como cuantificar la producción de dióxido de carbono, resultado del proceso de mineralización del hidrocarburo, tal como lo describió Pucci y colaboradores (2010), haciendo uso de hidróxido de sodio y una titulación con ácido clorhídrico y fenolftaleína.

2.4.2. Gravimetría

La cuantificación gravimétrica es un método analítico ampliamente utilizado para estimar la cantidad residual de hidrocarburos tras tratamientos de biodegradación, basado en su extracción con solventes no polares como cloroformo (Bekele et al*.,* 2023), diclorometano (Ozyurek & Bilkay, 2017), n-hexano (Ibrar & Zhang, 2020), entro otros y el secado de la fase residual previa a su pesada, para la evaporación del solvente. Este enfoque permite estimar los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) como porcentaje en estudios microbiano, dicha técnica se ha aplicado exitosamente para calcular la eliminación de petróleo en cultivos, mostrando correlación con otros indicadores como con el crecimiento celular (Ozyurek & Bilkay, 2017). Sin embargo, debido a las características e interacciones fisicoquímicas en el sistema, podría permitir evaluar las fases, tras la adición del solvente.

2.4.3. Espectroscopia infrarroja por Transformado de Fourier (FTIR)

El FT-IR es un método analítico, instrumental espectroscópico, que requiere de 3 componentes: un instrumento refractario (prisma IR u otro), un interferómetro y un detector; el cual mide todas las longitudes de onda de manera simultánea, generando un interferograma, un espectro único para cada compuesto. Cuyos picos en una gráfica (Transmitancia versus frecuencia) son el resultado de la interacción de la radiación con la muestra, lo que genera una vibración de sus átomos, teniendo en cuenta su estado de excitación en la región IR y sus enlaces; debido a que el movimiento de la molécula puede ser variado.

En torno al tipo de muestras, se pueden evaluar en los tres estados, cada una con sus especificaciones, para sólidos se preparan pastillas o películas, siendo en algunos casos necesario disolverlo en solventes, para líquidos va directamente y para gaseosos se usa una celda; y en todos los casos siempre teniendo contacto con el elemento inerte como el bromuro de potasio o el cloruro de sodio.

El espectro IR presenta 3 regiones: cercano de 14000 a 4000 cm^{-1}, medio de 4000 a 400 cm^{-1} y lejano de 400 a 10 cm^{-1}. Sin embargo, en el caso de los hidrocarburos sus picos se encuentran entre 3300 a 600 cm^{-1} (Dutta, 2017). Las muestras con petróleo se pueden analizar directamente en reflectancia total atenuada (ATR: Attenuated total reflectance), pero también mezclando la muestra con bromuro de potasio (Al-Kaabi et al*.*, 2022).

Respecto a los interferogramas obtenidos, Yang et al. (2019) realizaron rangos de longitud de onda relacionados al tipo de vibraciones y cambios en los enlaces; por consecuencia, lo que ello implicaría en muestras de hidrocarburos u otros compuestos hidrocarbonados. Dichas evaluaciones, aunque usualmente se ha usado para evaluar a los biosurfactantes (Rehman et al*.,* 2021), también se han aplicado en la evaluación de la degradación de hidrocarburos de petróleo (Wang et al., 2022), aunque junto a otras técnicas como GC-MS para confirmar la biodegradación (Patowary et al., 2016). Como también, se podría evaluar los cambios generados por otros factores no bióticos, tal como Dollah y colaboradores (2018) quienes analizaron en los interferograma del querosene, el efecto de un proceso de radiación ultrasónica.

III. HIPÓTESIS

La aplicación de surfactantes modifica positiva y significativamente la respuesta metabólica general de *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa*, evaluada mediante la actividad proteolítica, lipolítica y redox; y el comportamiento físico del petróleo crudo en cultivos donde este se incorpora como única fuente de carbono, en comparación con cultivos sin surfactantes.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de surfactantes sobre la respuesta metabólica general de *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa*; y sobre el comportamiento físico del petróleo crudo en cultivos donde este se incorpora como única fuente de carbono.

4.1. Objetivos específicos

- Caracterizar la respuesta metabólica general de *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de petróleo crudo mediante la evaluación de la actividad proteolítica, lipolítica y redox.

- Evaluar el efecto de surfactantes (extracto de *Allium cepa*, sobrenadante sonicado de *Pseudomonas aeruginosa* y Tween 80) sobre los indicadores metabólicos generales de *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa* en cultivos con petróleo crudo.

- Analizar los cambios en el comportamiento físico del petróleo crudo en cultivos bacterianos con y sin surfactantes.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio microbiológico-químico fue realizado en los laboratorios de Microbiología, Química y Biotecnología del Instituto Tecnológico de la Producción, Ventanilla-Callao y en el laboratorio de Biotecnología ambiental y bioprocesos industriales de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

El petróleo crudo fue obtenido como donación por La Refinería "La Pampilla" como parte de sus acciones de apoyo.

El cultivo se conformó por 22.5 mL de medio mínimo de sales (MMS), 0.250 mL de petróleo crudo y 2.5 ml de inóculo bacteriano con 0.08 - 0.1 DO. Este cultivo se puso a incubar a 35 °C por 7 días, con una agitación constante de 90 RPM.

Así también, los inóculos (DO: 0.1 – 0.15 abs. 600 nm) de las cepas seleccionadas se obtuvieron por reactivación en un cultivo de 24 horas a 35°C en caldo TSB, para luego con centrifugación a 1500 G por 15 minutos a 10 °C Y rehidratarse con caldo MMS 1:1. El MMS se preparó según Morales (2008), teniendo la siguiente composición: K_2HPO_4 (4.8 g/L), KH_2PO_4 (1.2 g/L), NH_4Cl (0.667 g/L), $CaCl_2$ (0.0188 g/L),$MgSO_4.7H_2O$ (0.2 g/L) y $FeSO_4.7H_2O$ (0.001 g/L).

Respecto a las condiciones de incubación, estas fueron llevadas a cabo en una incubadora con agitador orbital (Unidades: RPM); y para las centrifugaciones en centrífugas refrigeradas (unidades: G).

5.1. Cepas bacterianas

Se trabajó con tres cepas bacterianas pertenecientes al cepario del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP). Dos cepas correspondieron a *Bacillus thuringiensis* (8RP y 63RP), proporcionadas por la Universidad Privada Ricardo Palma (De los Ríos, 2021), aisladas de suelos de cultivo de cacao con presencia de cadmio.

La tercera cepa correspondió a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, cepa de origen clínico (aislado de muestra de sangre hospitalaria); seleccionada debido a que, en evaluaciones preliminares internas, evidenció crecimiento en presencia de hidrocarburos (diésel y petróleo crudo) y formación de estructuras micelares, comportamiento compatible con la producción de biosurfactantes. Adicionalmente, con base en su genoma reportado (Cao et al., 2017), esta cepa presenta genes asociados a procesos metabólicos y redox, así como a la interacción con compuestos orgánicos complejos, lo que sustenta su uso para la evaluación de respuestas metabólicas iniciales frente a petróleo crudo, sin asumir actividad hidrocarburoclástica específica.

Las cepas fueron manipuladas bajo las condiciones de bioseguridad establecidas según su clasificación, *Bacillus thuringiensis* bajo nivel de bioseguridad 1 (BSL-1) y

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, bajo nivel de bioseguridad 2 (BSL-2) siguiendo las prácticas de contención correspondientes. Como también, los residuos biológicos generados fueron sometidos a inactivación por autoclavado, según el plan de manejo de residuos sólidos en la facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM.

5.2. Diseño de evaluación

Se evaluó a los microorganismos, de manera aislada (*B. thuringiensis* y *P. aeruginosa*) y también conformando un consorcio bacteriano (C20 conformado por las dos cepas de *B. thuringiensis* en proporción 1:1), en un cultivo solo con petróleo crudo como única fuente de carbono y otro, donde se les adicionó distintas soluciones surfactantes para mejorar la biodisponibilidad del petróleo; un extracto de cebolla de las 2 capas externas, concentrado con butanol-2 (Pariona-Velarde et al., 2024); o tween 80. Así también, al consorcio de *Bacillus thuringiensis* se le agregó el sonicado de *Pseudomonas aeruginosa,* para la evaluación de la influencia de los ramnolípidos y enzimas producidos por *P. aeruginosa* durante 1 semana. Y otro, donde al consorcio se le adicionó a *P. aeruginosa* como cepa conformante, para evaluar su mejora tal como Al-Kaabi et al. (2022); esto se realizó en la misma proporción que las otras cepas y conservando el volumen de inóculo final de 2.5 mL, tal como se ve en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de los tratamientos experimentales utilizados en las distintas evaluaciones

Tratamientos	C20	C20 + *P. aeruginosa*	C20 + Tween 80	C20 + Extracto de cebolla	C20 + sonicado de *P. aeruginosa*	*Bacillus thuringiensis* (8RP/63RP)	Control
MMS	22.5 mL	22.5 mL	21.5 mL	21.5 mL	-	22.5 mL	25 mL
Petróleo	0.25 mL	0.25 mL	0.25 mL	0.25 mL	-	0.25 mL	0.25 mL
Consorcio C20	2.5 mL	1.666 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	-
P. aeruginosa	-	0.833 mL	-	-	-	-	-
Surfactante (extracto de cebolla o tween 80)	-	-	1 mL	1 mL	-	-	-
Sonicado de *P. aeruginosa* con MMS y petróleo	-	-	-		25 mL	-	

5.3. Evaluación metabólica de las bacterias

5.3.1. Evaluación de las actividades enzimática

Se evaluaron las actividades óxido-reductora (redox), lipolítica y proteolítica como indicadores del estado metabólico de las bacterias en los sistemas de cultivo con petróleo crudo, sin asumir relación directa con procesos específicos de degradación de hidrocarburos; para ello se tomó 1 ml del cultivo y se filtró con un filtro cualitativo ISOLAB ALEMÁN n° 4 para así evitar que el petróleo interfiera con los siguientes análisis, seguidamente se sonicó por 1 minuto a 10 °C.

Para la actividad redox, se evaluó según Hanson et al. (1993) con ciertas modificaciones, haciendo uso del indicador 2, 6-diclorofenol indofenol y en un sistema (Tabla 2) que se incubó a 40° C por 20 horas. Haciendo uso de la enzima laccasa como control positivo.

Tabla 2. Sistema de evaluación de la actividad óxido-reductora

Reactivo	Control negativo	Control positivo	Cepa
Buffer fosfato 50mM pH 7	520 uL	420 uL	420 uL
Indicador (0.05 %)	50 uL	50 uL	50 uL
Laccasa (1 %)	0 uL	100 uL	0 uL
Inóculo	0 uL	0 uL	100 uL
Volumen total	620 uL	620 uL	620 uL

Para la lectura de la actividad se centrifugó las muestras a 5000 G por 15 minutos a 10 °C; y es a partir del sobrenadante que se extrajo 200 ul y se leyó a 550 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se transformaron en porcentaje, tal como Iyobosa et al., (2021); con la siguiente ecuación:

$$\%\ Act.\acute{o}xido - reducción = 100 - \left(\frac{Abs.\ muestra\ x\ 100\ \%}{Abs.control\ negativo}\right)$$

Para segunda actividad, la lipolítica se realizó siguiendo a Gupta et al. (2002) con ciertas modificaciones, haciendo uso de p-nitrofenol-palmitato como sustrato y en un sistema (Tabla 3) que se incubó a 40° C por 20 horas. Haciendo uso del blend enzimático, pancreatina.

Tabla 3. Sistema de evaluación de la actividad lipolítica

Reactivo	Control negativo	Control positivo	Cepa
Buffer Tritón-HCl	350 uL	350 uL	350 uL
Sustrato	200 uL	200 uL	200 uL
Pancreatina (3 %)	0 uL	100 uL	0 uL

Inóculo	0 uL	0 uL	100 uL
Volumen total	650 uL	650 uL	650 uL

En la lectura de la actividad lipolítica se centrifugaron las muestras a 9500 G por 20 minutos a 10 °C; y es a partir del sobrenadante que se tomó 150 uL de sobrenadante y se le agregó 50 uL de KOH (10 %) para leerse espectrofotométricamente a 400 nm.

Por último, la actividad proteolítica, se realizó según García-Carreño et al. (1993) con ciertas modificaciones, haciendo uso de una solución al 1 % de azocaseína en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.5 y en un sistema (Tabla 4) que se incubó a 40 °C por 20 horas. Haciendo uso del blend enzimático, pancreatina.

Tabla 4. Sistema de evaluación de la actividad proteolítica

Reactivo	**Control negativo**	**Control positivo**	**Cepa**
Buffer Tris-HCl 50mM pH 8.5	550 uL	500 uL	500 uL
Solución de azocaseína (1 %)	200 uL	200 uL	200 uL
Agua destilada	50 uL	50 uL	50 uL
Pancreatina (1 %)	0 uL	50 uL	0 uL
Inóculo	0 uL	0 uL	50 uL
Volumen total	800 uL	800 uL	800 uL

Para la lectura, se detuvo la reacción agregando 50 ul de ácido tricloroacético (TCA) (50 %), seguidamente se centrifugaron a 9500 g por 10 minutos a 5 °C; se tomó 150 uL de sobrenadante y 50 uL de KOH (10 %) para leerse espectrofotométricamente a 400 nm.

Los valores de absorbancia de la actividad lipolítica y proteolítica también se evaluaron en porcentaje; y se transformaron con la siguiente ecuación:

$$\%\ Act.enzimática = \frac{Abs.\ muestra - Abs.control\ negativo}{Abs.control\ negativo - Abs.\ control\ positivo}\ x\ 100\ \%$$

5.3.2. Evaluación del crecimiento microbiano

La evaluación de crecimiento microbiano se realizó extrayendo 1 ml por muestra para obtener un pellet celular, mediante centrifugación a 2500 G por 15 minutos a 5 °C. Posteriormente, se rehidrató 1:1 con agua destilada para su lectura, se tomó 200 uL y se leyó a 600 nm.
Teniendo como índice de crecimiento a la siguiente ecuación:

$$Crecimiento\ =\ Do\ f - (Do\ i\ x \frac{Volumen\ de\ inóculo}{Volumen\ del\ sistema})$$

Donde:

Do f: Densidad óptica final
Do i: Densidad óptica inicial (inóculo inicial)

5.3.3. Evaluación de proteína soluble

Se evaluó la cantidad de proteína mediante la técnica de Lowry (1951), la cual permitió la cuantificación de proteína soluble usando como estándar a la albúmina, para lo cual se preparan las siguientes soluciones: Solución A compuesta por carbonato de sodio al 2% en 0.1 N NaOH, solución B compuesta por sulfato de cobre al 0.5% en tartrato de sodio y potasio al 1%, solución de Folin Ciocalteu en agua (1:3) y una solución estándar de albúmina al 0.1 %. Preparadas las soluciones, se juntaron la solución A y B en relación 50:1.
Para la evaluación inicialmente se realizó una curva con la solución de albúmina, en orden solución estándar, agua destilada, reactivo de Lowry, agitación en vórtex, seguido de un tiempo de reposo 15 a 20 minutos; por último, se agrega la solución de Folin, se repitió la homogeneización y el tiempo de reposo. Pasado el tiempo se toman 200 ul y se depositó en los pocillos de placas de Elisa para leerse a 550 nm. En el caso de las muestras, se tomó una alícuota de 100 uL y se completó hasta los 200 ul con agua destilada, para luego completarse con las otras soluciones (Lowry y Folin), teniendo en cuenta el orden y los mismos tiempos. tal como en la tabla 5 y en la figura 1.

Tabla 5. Sistema para la preparación de la curva estándar

#	Solución estándar	Agua	Reactivo de Lowry	olución Folin
A	200 ul	0 ul	1000 uL	100 uL
B	180 ul	20 ul	1000 uL	100 uL
C	140 ul	60 ul	1000 uL	100 uL
D	120 uL	80 uL	1000 uL	100 uL
E	80 uL	120 uL	1000 uL	100 uL
F	60 uL	140 uL	1000 uL	100 uL
G	40 uL	160 uL	1000 uL	100 uL
H	20 uL	180 uL	1000 uL	100 uL
I	0 uL	200 uL	1000 uL	100 uL

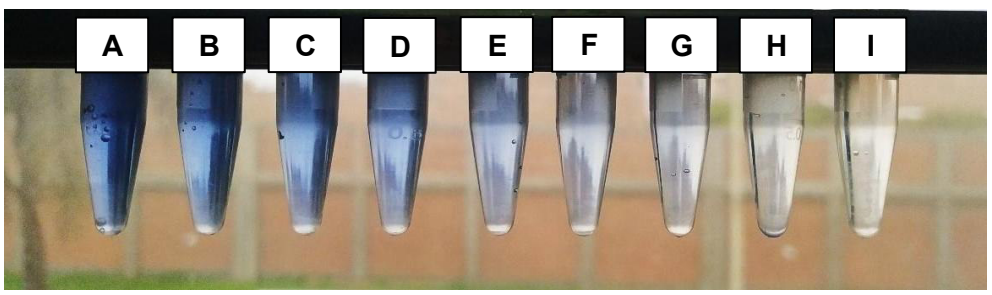


Figura 1. Curva estándar de albúmina al 0.1 %. De mayor concentración (A) a menor concentración (I).

5.4. Evaluación fisicoquímica del sistema

La evaluación del petróleo crudo se realizó mediante análisis visual y gravimétrico, con el fin de estimar la variación de la fracción de petróleo recuperable en presencia de bacterias con y sin surfactantes. Este análisis considera procesos físicos asociados al sistema, tales como emulsificación, redistribución de fases y posible adsorción del petróleo a la biomasa, sin asumir necesariamente que la disminución de la fracción recuperable corresponda exclusivamente a procesos de biodegradación.

La evaluación gravimétrica se realizó luego de la incubación durante 14 días. El contenido de los matraces se transfirió a una pera de decantación de 250 mL, se añadieron 20 mL de cloroformo y se agitó durante 45 segundos, dejándose reposar posteriormente por 30 minutos para permitir la separación de fases. La fracción cloroformo–petróleo se transfirió a otra pera de decantación, dejando la interfase y la fase acuosa, denominada fracción de petróleo libre. A esta fracción se le adicionaron 10 mL de diclorometano, se agitó nuevamente durante 45 segundos y se dejó reposar. Ambas fracciones orgánicas fueron filtradas mediante sulfato de sodio anhidro para eliminar residuos de agua.

En caso la separación de fases no se completara en el tiempo indicado, se extendió el reposo hasta 2,5 horas y se realizó una tercera extracción. Los balones colectores, previamente tarados, se llevaron a rotavapor a 100 rpm, 300 mbar y 40 °C, ajustando gradualmente las condiciones hasta eliminar los solventes, manteniéndose posteriormente durante 2 horas en campana de extracción para completar la evaporación. Finalmente, se determinó el peso del petróleo recuperado y se calculó el porcentaje de variación (Anexo 1).

Posteriormente, se compararon los pesos obtenidos por análisis gravimétrico. Obteniendo el porcentaje de disminución de petróleo, tal como Ibrar y Zhang (2020) con ligeras variaciones, mediante la siguiente fórmula:

$$\%\ de\ pérdida\ del\ petróleo\ crudo\ = \frac{Po - Pf}{Po} x\ 100\ \%$$

Donde:
Po: Peso del petróleo crudo recuperable del control abiótico
Pf: Peso del petróleo crudo recuperable del tratamiento a evaluar

5.5. Evaluación del petróleo emulsionado por FT IR

El petróleo extraído de la fracción emulsionada del control incubado, del consorcio C20 + *P. aeruginosa* sonicada, C20 + extracto de cebolla y solo *P. aeruginosa*; se evaluaron por espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), servicio que fue realizado por el laboratorio de Micología y Biotecnología de la UNALM; para describir, de manera exclusivamente cualitativa, las variaciones en las bandas del petróleo crudo después de la incubación.

El procedimiento fue llevado a cabo a partir del petróleo obtenido en 3 mL de cloroformo. Las mediciones se realizaron en un espectrómetro Nicolet iS10 (Thermo Scientific), en modo ATR (Attenuated Total Reflectance), empleando un láser HeNe en un rango espectral de 4000 a 400 cm^{-1}. Para cada muestra, se realizaron 64 escaneos con un tiempo de 1 segundo por escaneo.

5.6. Análisis e interpretación de datos

Para el tratamiento de los datos, los resultados se expresaron como promedios acompañados de sus respectivas desviaciones estándar, empleando Microsoft Excel. La comparación entre tratamientos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis, seguida del análisis post hoc de Dunn para la detección de diferencias específicas. Adicionalmente, con el objetivo de evaluar el comportamiento global de los cultivos, se aplicó un análisis de agrupamiento utilizando distancias euclídeas, lo que permitió visualizar la similitud entre tratamientos a partir de sus indicadores metabólicos. Finalmente, la fase de evaluación física del petróleo, posterior a la incubación con las bacterias, se representó mediante gráficos construidos en Excel.

VI. RESULTADOS

6.1. Evaluación metabólica de las bacterias

La evaluación metabólica se realizó mediante la estrategia de estimulación para mejorar la eficiencia del consorcio C20 y de bacterias (8RP y 63RP) al hacer uso de surfactantes de distintos orígenes: el biológico, ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* obtenido mediante la sonicación (Figura 2); el orgánico, extracto de cebolla concentrado con 2-butanol; y el químico, tween 80. Además, se agregó la cepa control, *P. aeruginosa* como cepa conformante del consorcio (Figura 3); sin embargo, aunque estas variaciones incrementaron algunos indicadores enzimáticos, no se obtuvo una mejora significativa en la degradación gravimétrica.

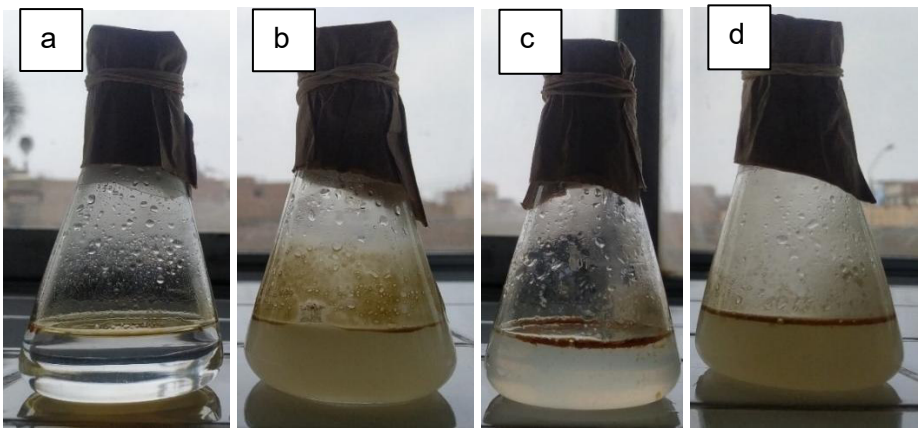


Figura 2. Evaluación visual tras la sonicación. (a) Control sin sonicar, (b) Control sonicado, (c) *Pseudomonas aeruginosa* sin sonicar, (d) *Pseudomonas aeruginosa*

sonicada

Asimismo, se evaluó la mejora del comportamiento de las cepas conformantes con el extracto de cebolla y el sonicado de *Pseudomonas aeruginosa.*

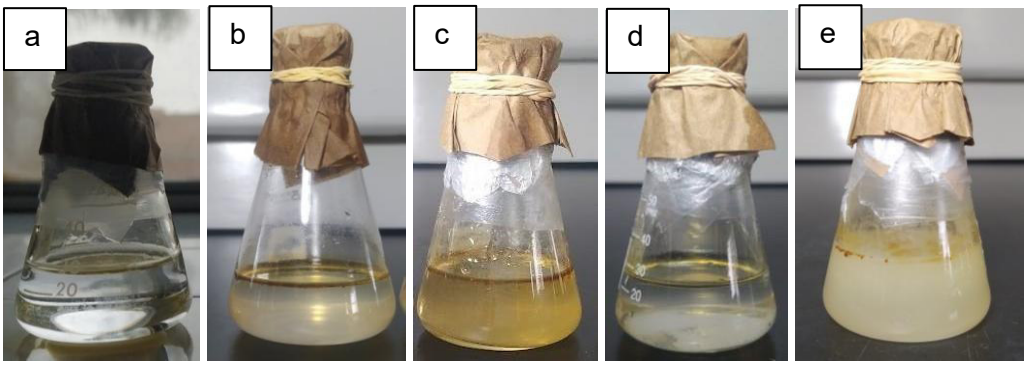


Figura 3. Cultivo microorganismos con petróleo a los 14 días de incubación. Control de contaminación (a), *Pseudomonas aeruginosa* sonicada con consorcio C20 (b), Extracto de cebolla con consorcio C20 (c), Tween 80 con consorcio C20 (d), *Pseudomonas aeruginosa* con C20 (e).

Inicialmente, tras una semana de incubación, se evaluó la influencia de los aditivos y variaciones sobre los microorganismos (Tabla 6). El análisis de Kruskal–Wallis ($p < 0.05$) indicó la existencia de diferencias significativas entre tratamientos, aunque la prueba de Dunn reveló que la mayoría no difirieron de manera clara, salvo algunos contrastes puntuales. En cuanto al crecimiento, el extracto de cebolla promovió una tendencia positiva tanto en cepas individuales como en consorcio; no obstante, este último presentó un crecimiento menor respecto a sus bacterias conformantes (*8RP* y *63RP*), a pesar de ser compatibles y pertenecer a la misma especie, aunque acompañado de una mayor actividad lipolítica. Respecto a la actividad proteolítica, todos los aditivos incrementaron la respuesta en cepas y en consorcio, excepto en *P. aeruginosa*, que mostró un comportamiento constante y homogéneo, agrupando estadísticamente los tratamientos que la incluían viva o sonicada; aunque solo cuando se encontraba viva tuvo un efecto más marcado en la producción de proteína soluble. Finalmente, en la actividad redox, el extracto de cebolla no generó inducción en ninguno de los microorganismos evaluados. En conjunto, estos resultados indican que, aunque muchas de las diferencias no se reflejan de manera estadísticamente robusta, sí se observan tendencias consistentes que sugieren un posible efecto estimulante del extracto de cebolla y de *P. aeruginosa* sobre la respuesta bacteriana (Tabla 7).

Gráficamente, el consorcio C20 tuvo un aumento de actividad proteolítica tras la adición de los surfactantes de origen vegetal y el químico; y un aumento de la actividad lipolítica con el surfactante de origen microbiano y con *P. aeruginosa* como cepa conformante del consorcio; por último, la actividad redox fue mayor con el surfactante de origen microbiano (Figura 4).

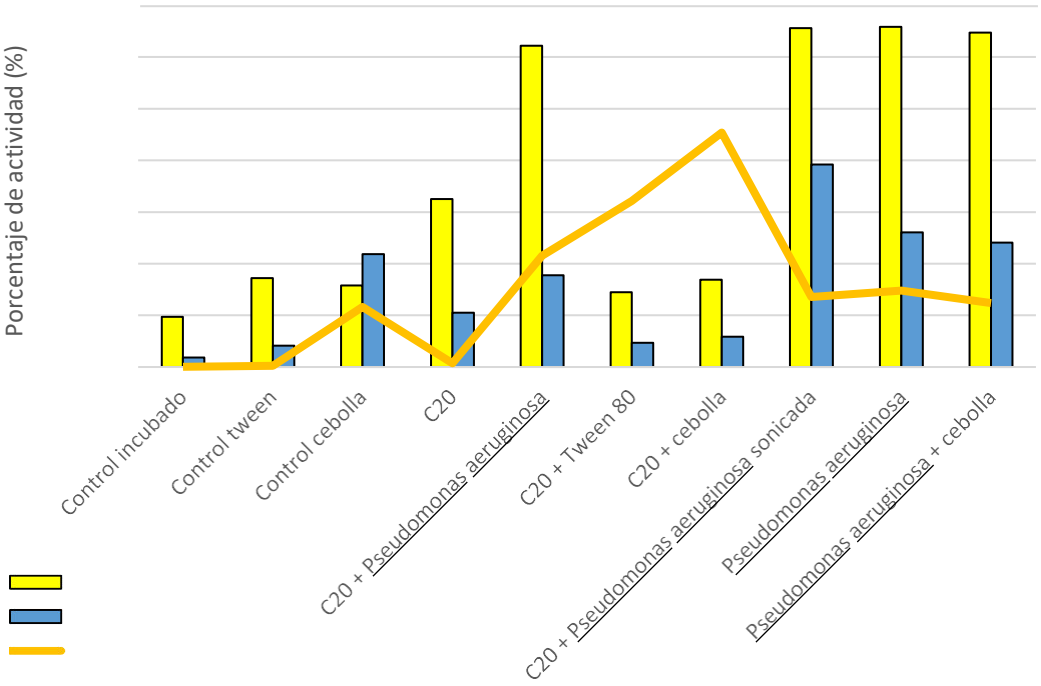


Figura 4. Evaluación de las actividades enzimáticas.

Tabla 6. Indicadores de selección del consorcio y de sus cepas conformantes

	pH(*)	Crecimiento(*)	% de actividad(*)			Proteína soluble (mg/mL)(*)
			Redox	Lipolítica	Proteolítica	
Control incubado	7.303 ± 0.045	0.059 ± 0.021	3.658 ± 2.216	19.359 ± 1.606	0.070 ± 0.080	0.014 ± 0.005
Control tween	7.345 ± 0.021	0.132 ± 0.022	8.317 ± 3.850	34.451 ± 2.768	0.470 ± 0.113	0.058 ± 0.002
Control cebolla	7.103 ± 0.081	0.423 ± 0.246	43.675 ± 10.406	31.614 ± 2.752	23.227 ± 1.252	0.373 ± 0.092
P. aeruginosa	7.108 ± 0.032	0.127 ± 0.016	52.144 ± 16.918	131.686 ± 3.281	29.528 ± 13.439	0.246 ± 0.065
***P. aeruginosa* + extracto de cebolla**	6.965 ± 0.007	0.360 ± 0.021	48.212 ± 7.078	129.493 ± 7.708	24.804 ± 0.631	0.444 ± 0.027
C20	7.310 ± 0.008	0.049 ± 0.002	21.013 ± 5.315	65.040 ± 8.949	1.416 ± 0.165	0.028 ± 0.003
C20 + *P. aeruginosa*	7.055 ± 0.007	0.244 ± 0.036	35.580 ± 2.212	124.448 ± 6.492	43.090 ± 0.594	0.199 ± 0.033
C20 + Tween	7.250 ± 0.000	0.242 ± 0.013	9.331 ± 1.520	29.005 ± 2.834	64.270 ± 3.379	0.077 ± 0.002
C20 + extracto de cebolla	7.140 ± 0.014	0.355 ± 0.015	11.706 ± 1.547	33.735 ± 1.088	90.787 ± 4.998	0.313 ± 0.015
C20 + *P. aeruginosa* sonicada	7.255 ± 0.007	0.490 ± 0.012	78.444 ± 4.425	131.235 ± 2.285	27.082 ± 1.418	0.298 ± 0.033
8RP	7.270 ± 0.000	0.096 ± 0.019	44.172 ± 1.759	13.025 ± 3.385	13.404 ± 0.453	0.005 ± 0.003
8RP + *P. aeruginosa* sonicada	7.135 ± 0.007	0.194 ± 0.041	28.186 ± 2.265	115.993 ± 9.474	37.022 ± 1.948	0.184 ± 0.012
8RP + extracto de cebolla	7.115 ± 0.007	0.205 ± 0.043	37.550 ± 9.240	25.059 ± 8.576	35.547 ± 0.778	0.357 ± 0.015
63RP	7.265 ± 0.007	0.105 ± 0.018	43.344 ± 0.833	17.260 ± 1.739	37.618 ± 1.082	0.009 ± 0.003
63RP + *P. aeruginosa* sonicada	7.120 ± 0.014	0.291 ± 0.015	58.452 ± 18.363	119.920 ± 1.762	66.332 ± 2.111	0.148 ± 0.007

63RP + extracto de cebolla	7.130 ± 0.000	0.216 ± 0.015	47.748 ± 12.388	30.364 ± 6.172	60.118 ± 0.892	0.349 ± 0.005

(*) Media ± desviación estándar

Tabla 7. Cuadro resumen de diferencias significativas y observaciones en los indicadores metabólicos

Variable	Tendencia global (Kruskal)	Tratamientos con mayor actividad	Tratamientos con menor actividad	Observaciones / Interpretación
Crecimiento	Diferencias significativas ($p < 0.001$)	C20 + extracto de cebolla C20 + *P. aeruginosa* sonicada *P. aeruginosa* + extracto de cebolla	8RP Control incubado C20	El extracto de cebolla pudo modular positivamente la respuesta de los microorganismos o hubo una sobreestimación por los compuestos del extracto (control con alto valor).
Actividad lipolítica	Diferencias significativas ($p < 0.001$)	*P. aeruginosa* C20 + *P. aeruginosa* sonicada *P. aeruginosa* + extracto de cebolla	8RP 63RP Control incubado	La actividad lipolítica depende más de la cepa que de los aditivos; ya que todos los cultivos con *P. aeruginosa* o su sonicado, tuvieron una alta actividad.
Actividad redox	Diferencias significativas ($p < 0.05$)	C20 + *P. aeruginosa*	Control incubado Control tween C20 + tween	El extracto de cebolla no indujo la actividad redox.
Actividad proteolítica	Diferencias significativas ($p < 0.001$)	C20 + extracto de cebolla	C20 Control incubado Control tween	El extracto de cebolla y el tween favorecieron la actividad proteolítica del consorcio C20. *P. aeruginosa* tuvo una actividad constante.
Proteína soluble (Lowry)	Diferencias significativas ($p < 0.001$)	*P. aeruginosa* + extracto de cebolla	63RP 8RP Control incubado	El extracto de cebolla aumenta proteína soluble; posible sobrestimación por compuestos del extracto.

En el caso del pH como indicador, no se aplicó ANOVA debido a su baja variabilidad; sin embargo, se observó tendencias entre los tratamientos, resaltando los que disminuyeron el pH del cultivo en menos de 7.10; tales como el control de extracto de cebolla, *P. aeruginosa* + cebolla, *P. aeruginosa* y C20 + *P. aeruginosa.* Variación que refleja una actividad media a alta, por la acidificación; aunque en algunos casos, el efecto acidificante puede atribuirse también a los compuestos propios presentes en el extracto de cebolla.

Por último, para evaluar el comportamiento global usando todos los indicadores, se agruparon mediante un análisis de conglomerados jerárquicos utilizando distancia euclídea y el método de ligamiento promedio, en base a los datos de la Tabla 6. El análisis mostró un coeficiente cofenético de 0.926, lo que indica que el dendrograma obtenido es altamente confiable (Figura 5). Se observó que los tratamientos C20 + extracto de cebolla y C20 + tween 80 se agruparon en un mismo clado, lo que refleja un comportamiento similar de ambos estimulantes sobre el consorcio. De manera destacada, todos los tratamientos que incluyeron a *P. aeruginosa* —ya sea en cultivo puro o como agregado al consorcio, en su forma viva o sonicada— se agruparon en un mismo conjunto, lo que evidencia la influencia de esta cepa como factor determinante en la variación de los indicadores metabólicos. Este agrupamiento confirma que la incorporación de *P. aeruginosa* favoreció el aumento de la actividad enzimática y de otros parámetros evaluados, reforzando su rol clave en la mejora del consorcio.

Por otro lado, los tratamientos con extracto de cebolla mostraron una clara separación en el dendrograma: mientras que en combinación con el consorcio C20 se agruparon junto con el tween 80, indicando que su efecto sobre el sistema es similar; los controles con solo extracto de cebolla y las cepas individuales (8RP y 63RP) quedaron en clados independientes y más alejados, lo que sugiere que la respuesta del sistema depende tanto de la interacción con el inóculo como del efecto directo del aditivo.

Finalmente, el control incubado y el control con tween sin inóculo se agruparon de manera cercana, junto con el consorcio C20 sin estimulación, indicando un comportamiento similar entre ellos y reflejando la baja respuesta del consorcio en ausencia de estímulos externos. Esto confirma que la estimulación externa, ya sea por aditivos o por la incorporación de una cepa altamente activa como *P. aeruginosa* es necesaria para potenciar la actividad del consorcio y generar diferencias significativas respecto al control.

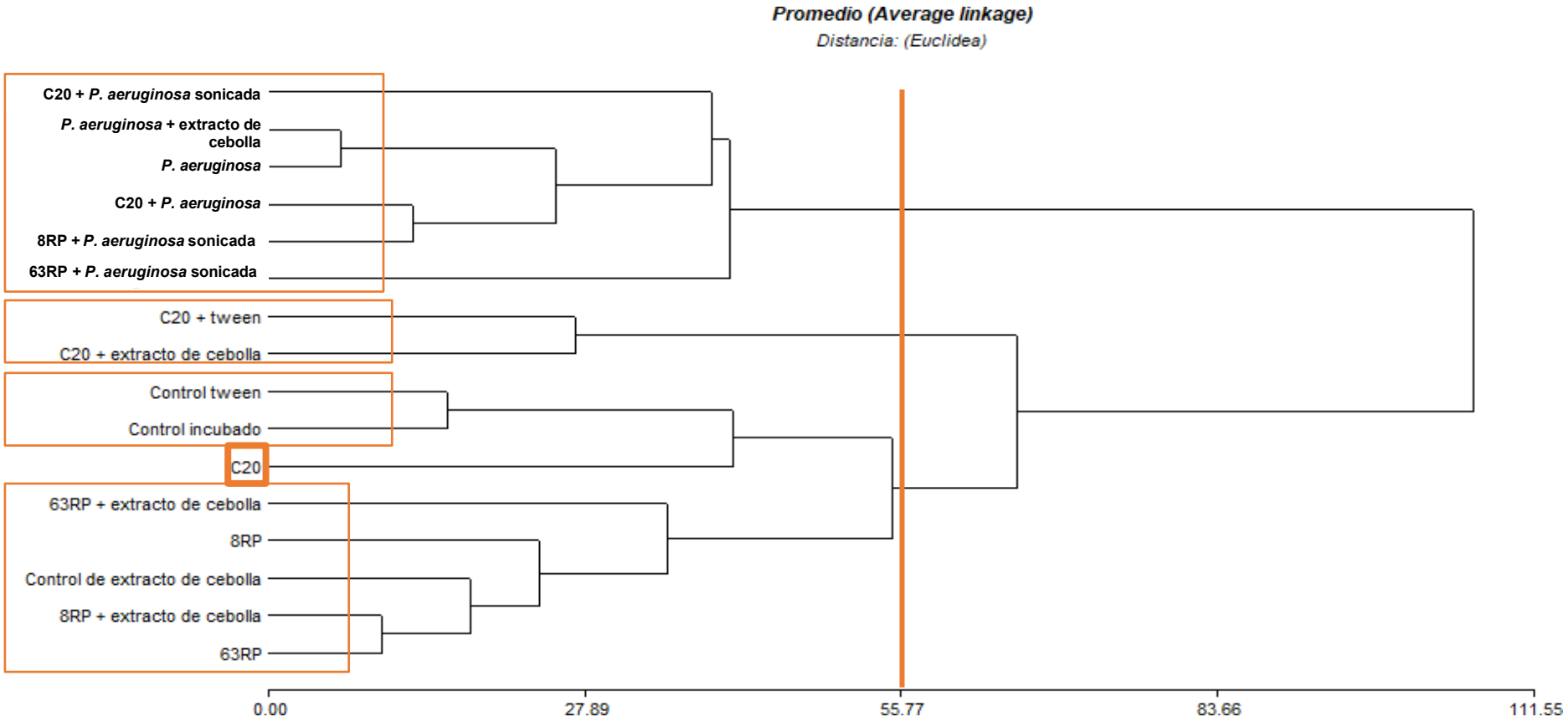


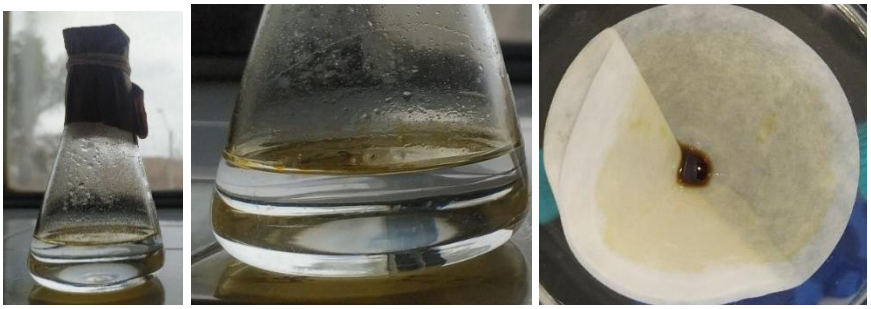
Figura 5. Dendograma basado en distancias Euclídea. Indicadores usados: Actividades enzimáticas, crecimiento, pH final y producción de proteína de la mejora del consorcio y variaciones.

6.2. Evaluación física del sistema

Además, tras su incubación, visualmente se pudo detectar cambios a nivel filtración, para obtener extractos para la evaluación de los indicadores a los 7 días; y a nivel de extracción para la evaluación gravimétrica a los 14 días, tras la concentración con solventes polares (Figura 6).

CONTROL DE CONTAMINACIÓN

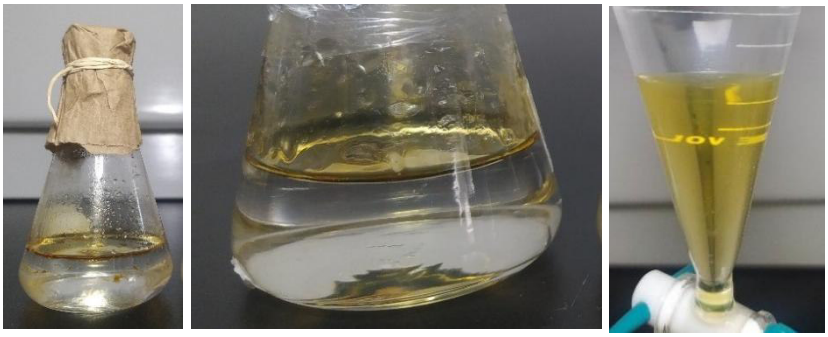
7 días: Evaluación visual



Observación: No hubo formación de micelas, la capa de petróleo se mantuvo homogénea, el líquido transparente.

Filtración: No hubo formación de grumos, la capa fue homogénea sobre el papel

14 días: Evaluación gravimétrica



Apariencia del petróleo: Homogéneo, se adhiere a las paredes.

Extracción: La separación del petróleo fue instantánea, sin formación alguna en la interfase, ambas fases fueron transparentes.

Pseudomonas aeruginosa

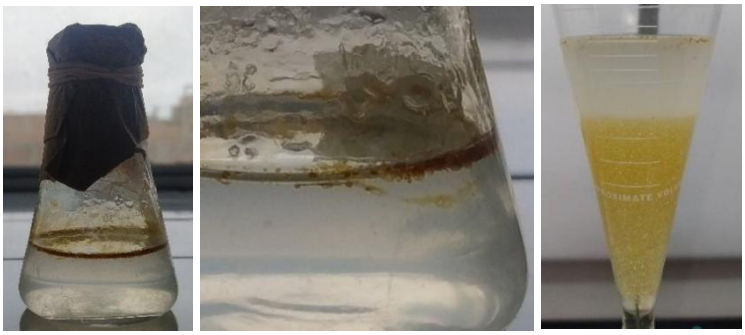
7 días: Evaluación visual



Observación: Hubo formación de micelas pequeñas y estables, el líquido estaba turbio y blanquecino.

Filtración: Hubo formación de grumos en las paredes del papel que se mantuvieron.

14 días: Evaluación gravimétrica

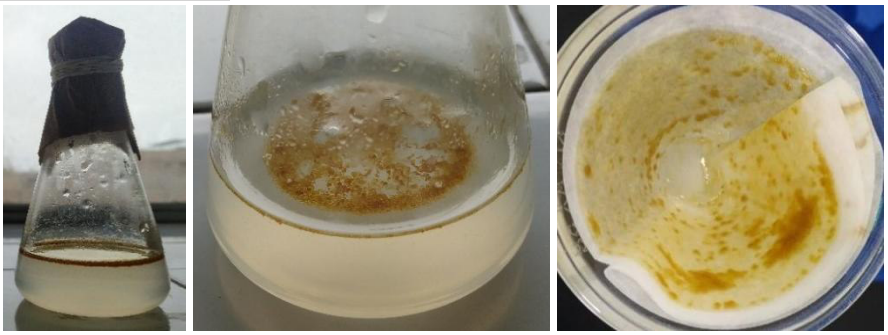


Apariencia del petróleo: Formación de micelas estables

Extracción: Se formó una emulsión grande entre agua-biosurfactante-petróleo-cloroformo.

C20 + *P. aeruginosa*

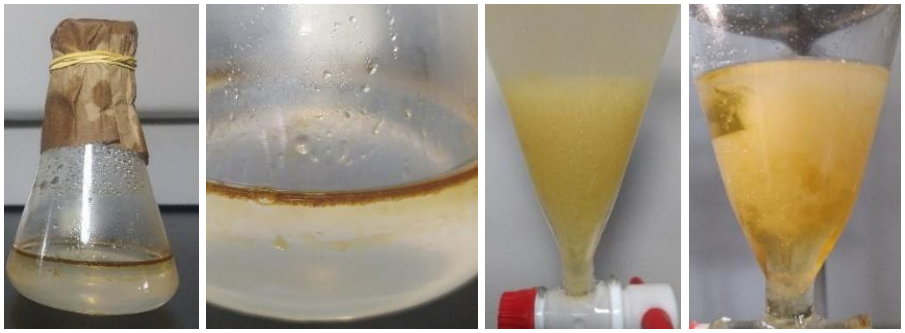
7 días: Evaluación visual



Observación: Hubo formación de micelas pequeñas y estables.

Filtración: Hubo formación de grumos en las paredes del papel que se mantuvieron.

14 días: Evaluación gravimétrica



Apariencia del petróleo: Formación de micelas, todo el petróleo se concentró a los bordes.

Extracción: Hubo formación de 2 fases, observándose en la segunda una nube de emulsión y micelas de petróleo-cloroformo-material celular/productos, los cuales se mantuvieron (> 2h 30 min), se tuvo que hacer un tercer fraccionamiento.

CONTROL DE EXTRACTO DE CEBOLLA

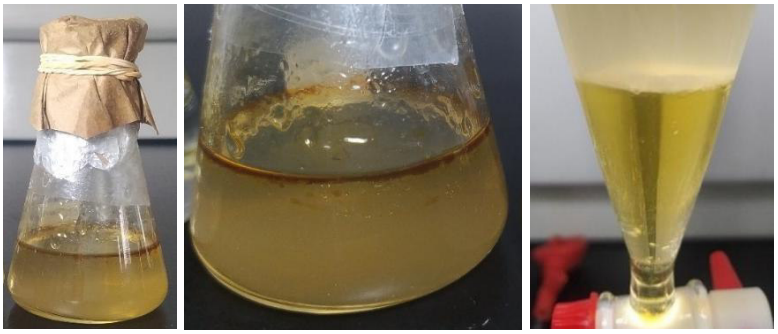
7 días: Evaluación visual



Observación: Hubo formación de micelas de diversos tamaños

Filtrado: Hubo formación de grumos en la pared del papel

14 días: Evaluación gravimétrica

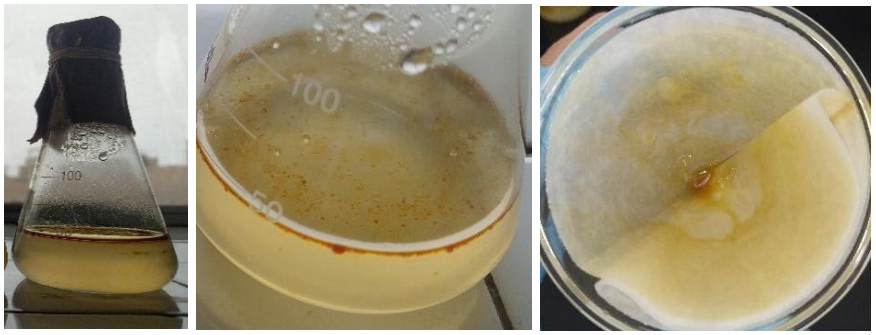


Apariencia del petróleo: Formación de micelas, todo el petróleo se concentró a los bordes.

Extracción: La separación se dio dentro de los 30 min, se formó una capa blanquecina en la interfase

C20 + EXTRACTO DE CEBOLLA

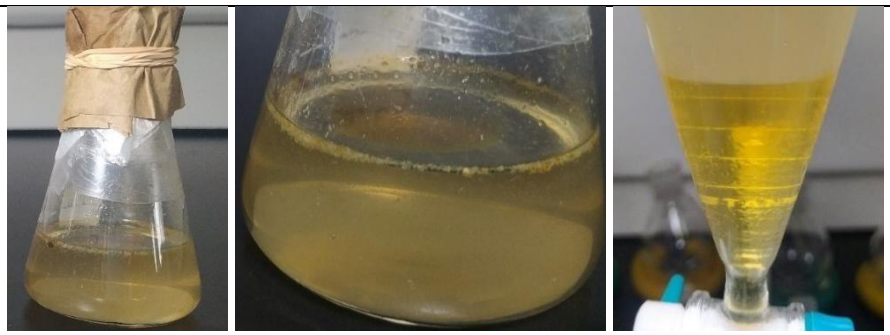
7 días: Evaluación visual



Observación: Hubo formación de micelas en menor cantidad que su control, pequeñas en su mayoría

Filtrado: Hubo una gomosidad que hizo que demorará y se taponeara el filtro; por lo que, se tuvo que usar dos filtros.

14 días: Evaluación gravimétrica

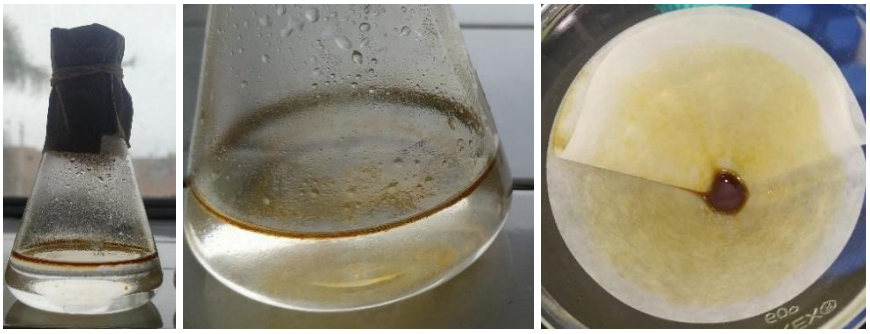


Apariencia del petróleo: Formación de micelas, el petróleo estaba como manchas en el centro, en los bordes había unas micelas blanquecinas.

Extracción: La separación se dio dentro de los 30 min, se formó una capa blanquecina en la interfase

CONTROL DE TWEEN 80

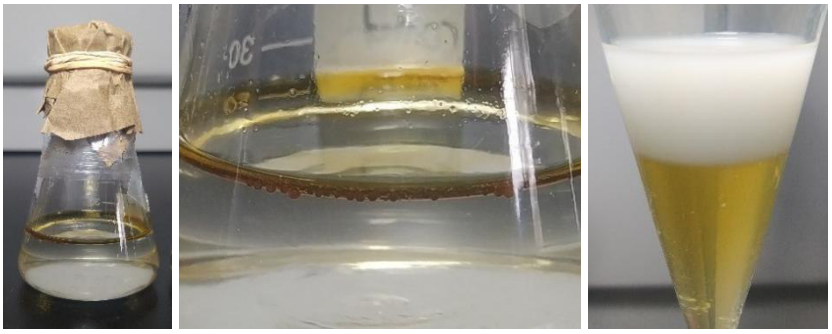
7 días: Evaluación visual



Observación: Hubo formación de micelas pequeñas y homogéneas, el líquido estaba ligeramente blanquecino, propio de una emulsión.

Filtración: No hubo formación de grumos, se observó una capa homogénea en el papel.

14 días: Evaluación gravimétrica



Apariencia del petróleo: Formación de micelas, el petróleo estaba concentrado a los bordes.

Extracción: La separación se dio dentro de los 30 min, el líquido superior (parte acuosa) era totalmente blanquecina por el surfactante.

C20 + TWEEN 80

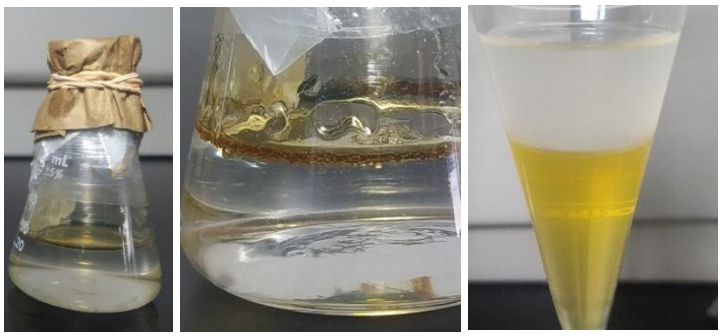
7 días: Evaluación visual



Observación: Hubo formación de micelas pequeñas y estables, líquido blanquecino, propio de una emulsión

Filtración: No hubo grumo, el petróleo homogéneo sobre el papel

14 días: Evaluación gravimétrica

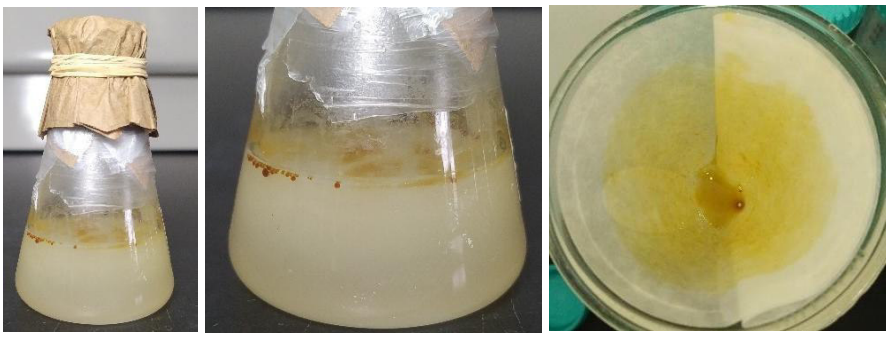


Apariencia del petróleo: Formación de micelas, el petróleo estaba concentrado a los bordes.

Extracción: La separación se dio dentro de los 30 min, el líquido superior (parte acuosa) era menos blanco que el control correspondiente.

C20 + *P. aeruginosa* sonicada

7 días: Evaluación visual



Observación: Hubo formación de pocas micelas de distintos tamaños y estables; además, el líquido estaba blanquecino, propio de una emulsión.

Filtración: No hubo grumo, el petróleo homogéneo sobre el papel; sin embargo, se veía más concentrado.

14 días: Evaluación gravimétrica

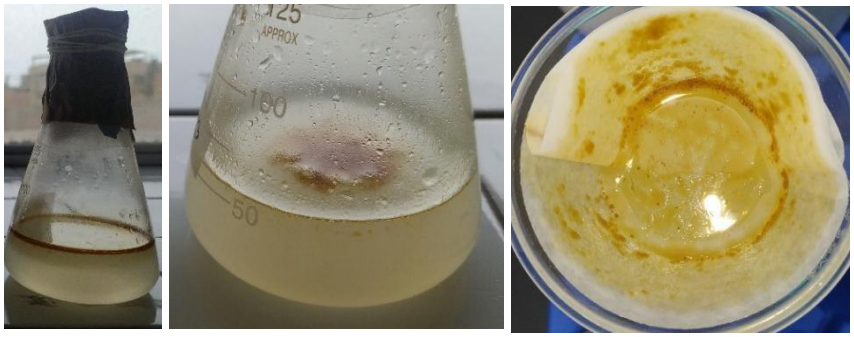


Apariencia del petróleo: Formación de micelas, el petróleo estaba concentrado a los bordes.

Extracción: Si hubo separación de fases, la fase acuosa estaba blanquecina y posterior a la separación se obtuvo gran cantidad de producto celular

63RP + *P. aeruginosa* sonicada

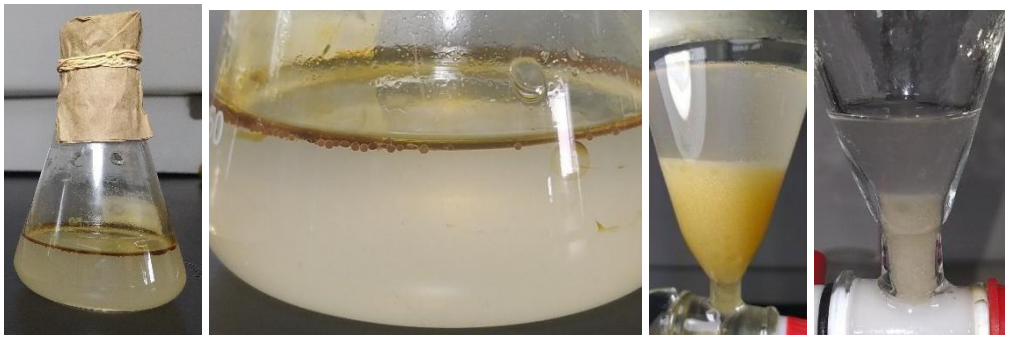
7 días: Evaluación visual



Observación: Hubo formación de micelas pequeñas y homogéneas.

Filtrado: Hubo acumulación de grumos en la pared del filtro, lo que demoró y taponeó la filtración.

14 días: Evaluación gravimétrica

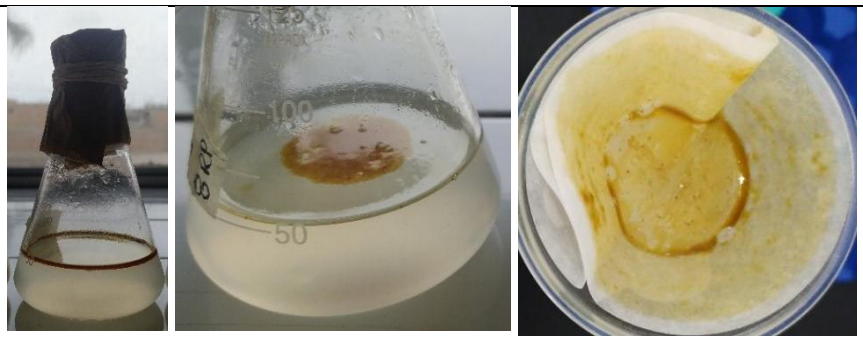


Apariencia del petróleo: Formación de micelas, el petróleo estaba concentrado a los bordes.

Extracción: La separación tardó (> 2h 30 min), se hizo 3 extracciones

8RP + *P. aeruginosa* sonicada

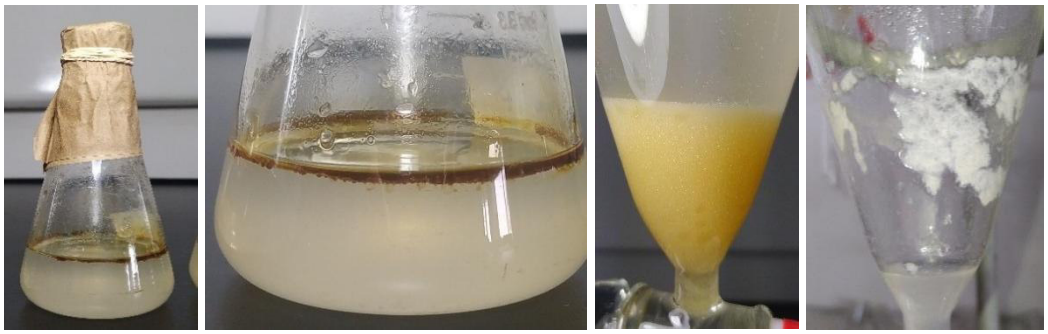
7 días: Evaluación visual



Observación: Hubo formación de micelas, pequeñas y homogéneas

Filtrado: Hubo formación de grumos en la parde del filtro, lo que demoró y taponeó la filtración.

14 días: Evaluación gravimétrica



Apariencia del petróleo: Formación de micelas, el petróleo estaba concentrado a los bordes.

Extracción: Uno de los matraces se separó dentro de los 30 min; sin embargo, el otro, no se separó y se tuvo que hacer 3 fracciones.

Figura 6. Evaluación visual de los consorcios a los 7 y 14 días de incubación con sus respectivas observaciones.

Cambios que, aunque no se reflejaron en degradación del petróleo (reducción de petróleo con respecto al control incubado), propiamente dicho; sí en la capacidad de emulsionar el hidrocarburo (2da y 3era fracción); evidenciado al tener que requerir mayor cantidad de solvente para separar la emulsión de la capa petróleo-cloroformo. Esto también se observó al evaluar los valores obtenido de petróleo por gravimetría (Tabla 8), en especial por el petróleo concentrado en la fracción emulsionada, la segunda y tercera fracción.

Tabla 8. Evaluación de la reducción de petróleo y de la fracción emulsionada del consorcio seleccionado, de los controles y de las cepas de manera individual.

CONSORCIO	%				
	1era fracción	**2da fracción**	**3 era fracción**	**Petróleo emulsionado**	**Petróleo reducido**
Control incubado	61.544	1.628	-	1.628	36.829
Control tween	66.514	2.216	-	2.216	31.270
Control cebolla	58.450	5.680	-	5.680	35.869

Control sonicado	64.176	2.527	-	2.527	33.297
C20	62.586	5.090	-	5.090	32.324
C20 + *P. aeruginosa*	50.279	7.509	1.414	8.923	40.797
C20 + Tween	70.495	1.838	-	1.838	27.667
C20 + Cebolla	65.387	3.964	-	3.964	30.649
C20 + *P. aeruginosa* sonicada	53.405	6.703	-	6.703	39.892
8RP	65.027	1.261	-	1.261	33.712
8RP + cebolla	69.477	2.784	-	2.784	27.739
8RP + *P. aeruginosa* sonicada	46.788	3.306	3.441	6.748	46.464
63RP	64.054	1.297	-	1.297	34.649
63RP + cebolla	65.946	2.036	-	2.036	32.018
63RP + *P. aeruginosa* sonicada	57.095	0.631	1.685	2.315	40.590
P. aeruginosa	52.360	2.928	1.640	4.568	43.072
P. aeruginosa + cebolla	48.622	6.234	2.739	8.973	42.405

En la figura 7 se puede observar como la adición del surfactante orgánico microbiano y la presencia de una cepa productora de ramnolípidos aumentaron la fracción emulsionada.

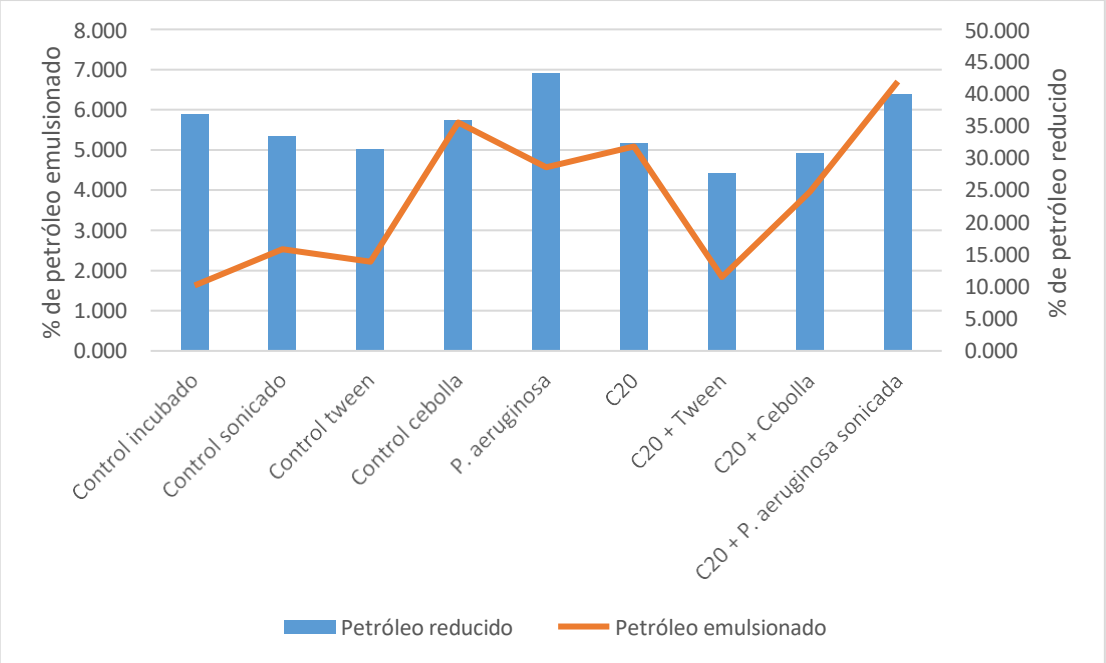


Figura 7. Evaluación de los porcentajes de degradación y de emulsión.

6.3. Evaluación del petróleo por FT IR

Inicialmente se evaluó el petróleo, de manera directa, por FT IR-ATR, el cual al compararse en el software KnowItAll resultó en una coincidencia de lectura en más de un 98 % con queroseno (Figura 8).
En caso de las muestras, se realizaron evaluaciones de la fracción emulsionada, y ello se prefirió en ves de la fracción recuperada total debido a que no hubo gran diferencia con respecto al control, ya que los valores estuvieron alrededor de 35.838 ± 5.55 %.

Al consorcio, C20 más *P. aeruginosa* sonicada y a los controles se les evaluó la fracción emulsionada (segunda y tercera fracción unidas), obteniendo sus espectros infrarrojos; los cuales mostraron algunos cambios alrededor de 1400 cm^{-1} y de 3000 cm^{-1} (Figuras 9); sin embargo, estos al estar diluidos en cloroformo, no se logró observar los picos característicos del petróleo de manera directa, con picos entre 1300-1500 y 2700-3200 cm^{-1}, observados en la Figura 10.

De manera cualitativa, se observó cambios respecto a la intensidad entre el espectro del control incubado con el consorcio y *P. aeruginosa*, lo cual concuerda con la menor presencia de una fase emulsionada recuperada en el control. Por el contrario, los tratamientos con *P. aeruginosa*, especialmente la mezcla con C20 sonicado, presentan espectros ligeramente más definidos, lo que sugiere una mayor cantidad de compuestos hidrocarbonados retenidos en la fase emulsionada.

En los espectros FTIR de las fracciones emulsionadas (2700–3200 cm^{-1}) se identificaron las bandas típicas de los estiramientos C–H alifáticos (2850 y 2920 cm^{-1}). El petróleo directo presentó la mayor intensidad, mientras que en el control incubado se mantuvieron señales similares con ligera disminución. En los tratamientos con *P. aeruginosa* y con el consorcio C20 + *P. aeruginosa* sonicada, las señales se atenuaron significativamente, evidenciando una reducción en la proporción de compuestos alifáticos. Esto sugiere que la interacción microbiana pudo promover la transformación de hidrocarburos presentes en la fase emulsionada.

Estas diferencias indican que la interacción entre la bacteria y/o sus productos con el petróleo, especialmente al aplicar sonicación, podría favorecer la formación de emulsiones más estables; siendo el perfil espectral más intenso y definido el del tratamiento con C20 + *P. aeruginosa* sonicado.

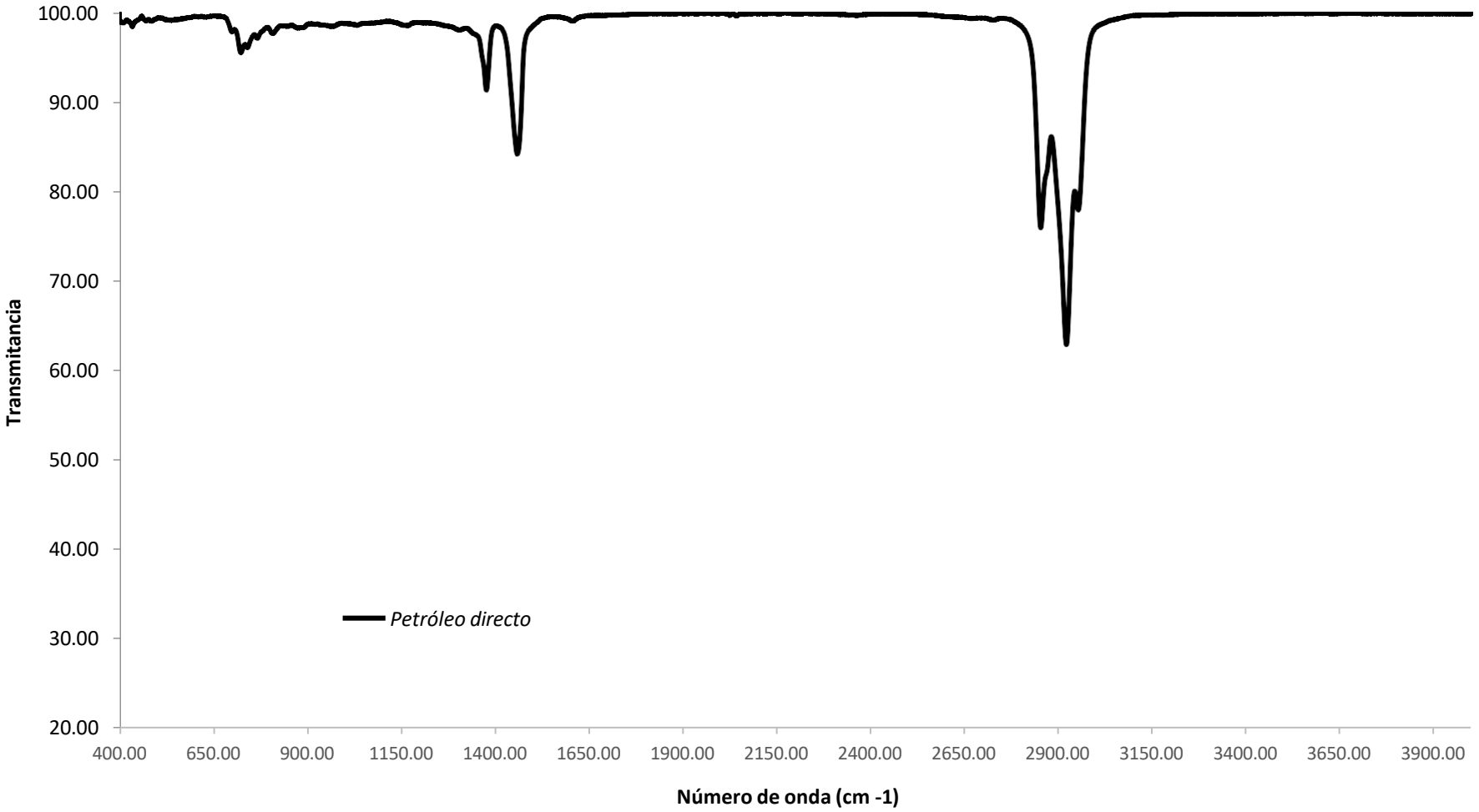


Figura 8. Evaluación del petróleo crudo sin incubación

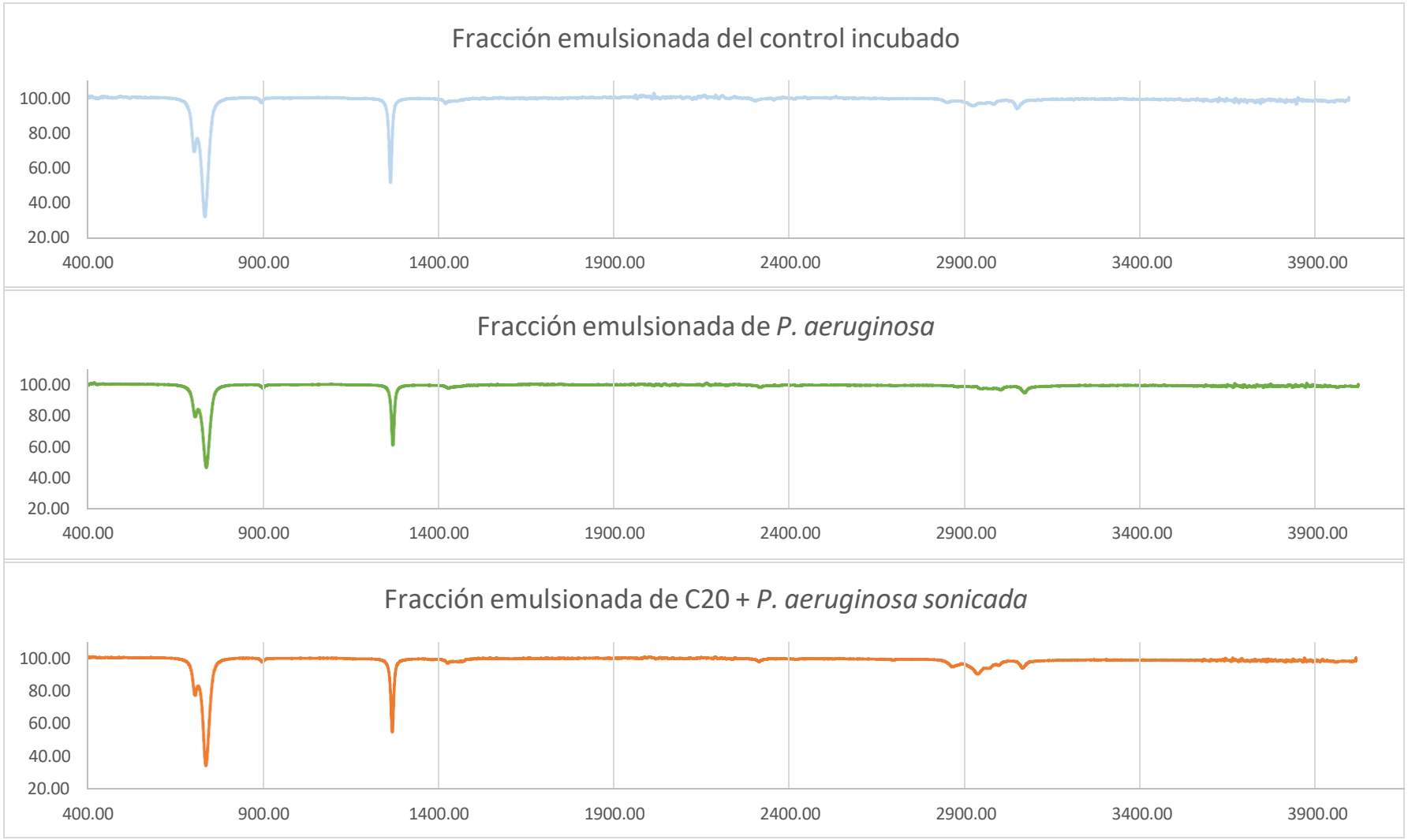


Figura 9. Evaluación de la fracción emulsionada

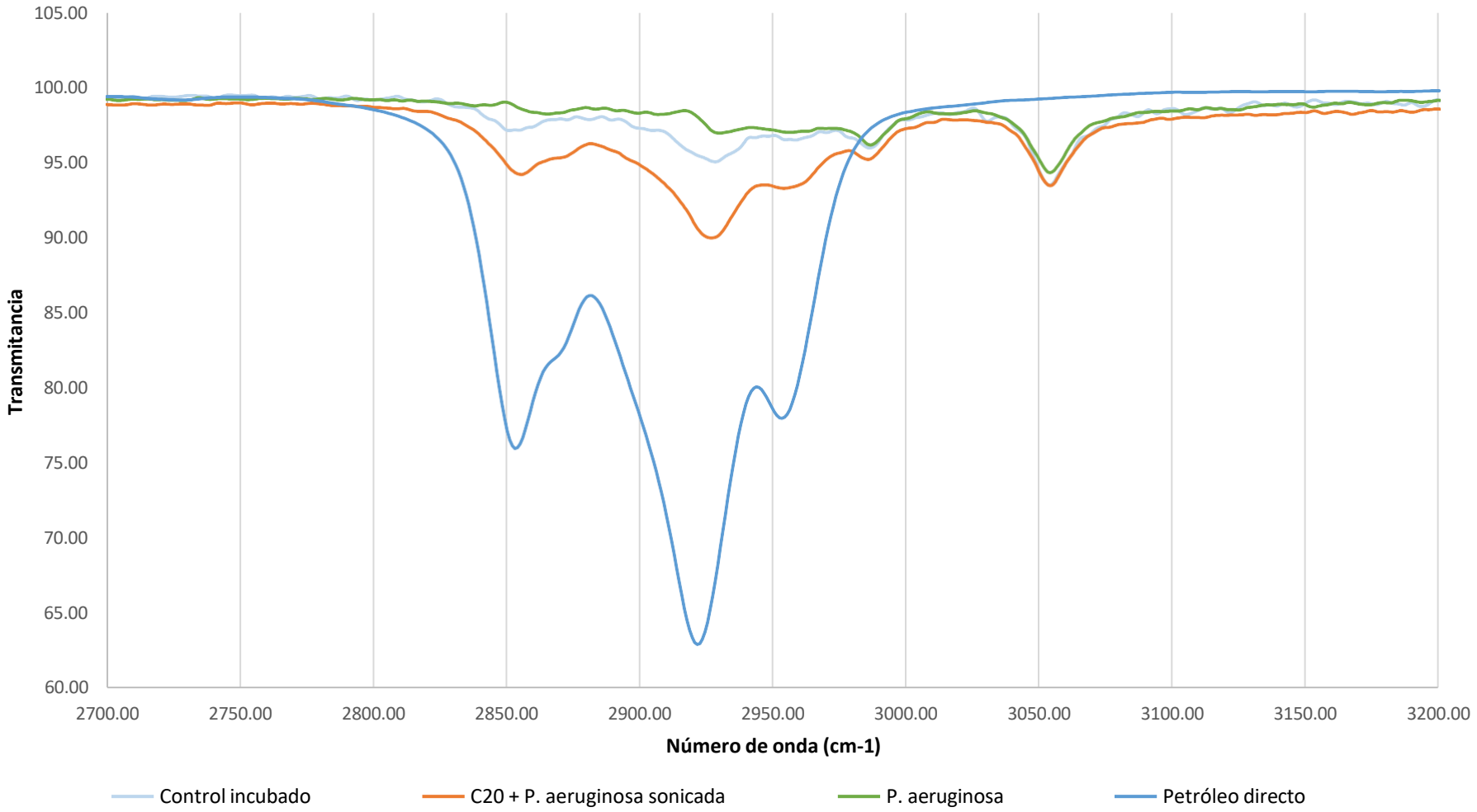


Figura 10. Comparación de las curvas entre 2700-3200 cm^{-1}. El petróleo directo es el sustrato sin la adición y sin pasar por ningún tratamiento; los demás son la fracción emulsionada, obtenidos en la extracción del petróleo.

VII. DISCUSIÓN

7.1. Evaluación metabólica de la interacción bacteria-petróleo

La actividad óxido-reductora está vinculada al catabolismo de hidrocarburos, especialmente alcanos, que son degradados mediante reacciones de oxidación, convergiendo finalmente en la vía de β-oxidación, así como lo reportó Quin et al. (2012) al obtener una correlación positiva entre la actividad deshidrogenasa con la tasa de degradación de hidrocarburos de petróleo. Esta actividad es un indicador clave de la capacidad adaptativa inicial de los microorganismos, ya que requiere interacción directa entre el hidrocarburo y la membrana celular, donde se localizan enzimas como hidrolasas, deshidrogenasas y oxigenasas; posición transmembrana evaluada por Whyte et al. (2002) en el caso de oxigenasas como alcano hidoxilasa, conservada en especies de *Rhodococcus,* para la acción sobre hidrocarburos con un rango específico de carbonos.

En este estudio, sin estimulación, *P. aeruginosa* presentó una actividad redox superior al 50 %, lo que reflejó directamente su respuesta ante la interacción con el petróleo. las cepas *B. thuringiensis* (8RP y 63RP) alcanzaron entre 42–46 %, y el consorcio C20, un 21 %, con lo cual se resalta que, en conjunto, las cepas no tienen una actividad sinérgica con esta actividad. Valores menores que los reportados por Lyobosa el al. (2021), quienes observaron 50–70 % usando solo aceite de motor.

Así también, al adicionar extracto de cebolla, la actividad disminuyó en la mayoría de los casos, excepto en 63RP (ligero aumento) y al agregar Tween 80 al consorcio C20, la actividad cayó a 9.3 %; esto pudo ser resultado de que compuestos del extracto de cebolla limitaron el crecimiento, por un efecto antibiótico de ciertos compuestos fuertemente antioxidantes como lo describen Sagar et al. (2022) o que estos microorganismos consumieron el bioestimulante, como ha sido reportado por Periche y Robles (2016) con Tween 80, en un periodo de 168 horas, por lo que no requirieron expresar este tipo de enzimas. Resaltando que esta deficiencia también puede ser indicativo de que no tendrían actividad degradativa del hidrocarburo; ya que Hashmat el al. (2023) encontraron que, en cepas con actividad, la adición de surfactante/nutriente/aireación aumentó el número de copias del gen alkB (~ Aumento de la actividad) y la propia degradación del petróleo o también como Qin el al. (2012) que reportaron un aumento de esta actividad con nutrientes. Aunque contrariamente, la reducción de la actividad redox tras añadir nutrientes ya ha sido descrita por Li el al. (2023), donde se inhibió la actividad deshidrogenasa pese a la bioestimulación.

En la evaluación de la actividad lipolítica, sin estimulación, *P. aeruginosa* mostró una alta actividad (131.7 %), lo que refleja su capacidad innata para producir lipasas y lo que se

confirmó al agruparse todas sus variaciones (*P. aeruginosa* viva o sonicada) en un clúster en el análisis de conglomerados; a diferencia de las cepas de *Bacillus,* con una actividad entre 10–20 %; actividad que en consorcio (C20) aumentó a 65 %, lo que indica su comportamiento sinérgico para esta actividad. Tras añadir extracto de cebolla, la actividad disminuyó en *P. aeruginosa* y C20, pero se duplicó en las cepas de *Bacillus* (aunque sin superar el 50 %); y con Tween 80, la actividad del consorcio bajó a 29 %. Y pese a no estar adaptadas al hidrocarburo, esta respuesta como parte de la ruta de la β-oxidación (ruta de degradación de lípidos), demostró la tolerancia y el poder evaluar cepas no adaptadas permitiendo detectar la activación fenotípica tras la interacción. Esto contrasta con estudios como el de Ordonez et al. (2028) quienes evalúan cepas de ambientes contaminados, ya adaptadas.

Además, metodológicamente se identificó una limitación con la técnica evaluada: a pH >7 se degradaba el sustrato p-nitrofenilpalmitato, lo que en cultivos que varíen el pH del medio, podría ser un factor para un falso positivo; por lo que métodos como el titrimétrico podrían ser más fiables, al ser usadas para la caracterización de lipasas, como lo aplicó Daniele el al. (2010).

Los hidrocarburos, aunque son compuestos sin aporte de proteínas como sustrato directo; las cepas evaluadas presentaron una actividad proteolítica basal, la cual se incrementó bajo condiciones de estimulación. Este comportamiento puede explicarse porque las proteasas cumplen un rol clave en la regulación fisiológica, el recambio de proteínas y la adaptación frente a condiciones de estrés, procesos descritos por Rawlings el al. (2004) como se cita en Razzaq el al. (2019). En este contexto, la marcada respuesta del consorcio C20, que pasó de 1.4 % a 90.8 % al adicionarse extracto de cebolla, podría estar asociada tanto a la utilización de compuestos presentes en el extracto o a un mayor recambio proteico inducido por estrés metabólico.

Es importante señalar que las actividades enzimáticas evaluadas en este estudio (redox, lipolítica y proteolítica) no fueron utilizadas como indicadores directos de degradación de hidrocarburos, sino como marcadores de metabolismo bacteriano general. Estas actividades reflejan respuestas fisiológicas inespecíficas asociadas a estrés químico, adaptación temprana y ajuste celular frente al ambiente hidrofóbico generado por el petróleo crudo. Por tanto, el incremento observado en dichas actividades no se interpreta como evidencia de metabolismo hidrocarburoclástico, sino como expresión de actividad metabólica basal y de supervivencia.

El crecimiento, ha sido el indicador de selección más usado en los estudios de biodegradación de hidrocarburos, debido a que el incremento de biomasa microbiana es resultado del uso del hidrocarburo como fuente de carbono y energía o para evaluar el efecto de un aditivo o surfactante como Periche y Robles (2016), además de que también

se pueden utilizar para medir la adaptación, al realizar sucesivos pases de los microorganismos en exposición al contaminante, como hicieron Bahobail, el al. (2016). Y aunque en el presente estudio, sin estimulación se obtuvo absorbancias de 0.049 (C20) a 0.127 (*P. aeruginosa*); con el extracto de cebolla y tween 80 se logró incrementar los valores, lo que indicó que los surfactantes mejoraron la biodisponibilidad del petróleo y con ella la interacción con las bacterias. Sin embargo, todas estas cifras resultaron menores a las de Ordoñez el al. (2018) (absorbancia ~1), lo que directamente se puede atribuir a la falta de preadaptación de las cepas; como también que el crecimiento celular registrado pudo ser solo una respuesta metabólica inicial asociado a utilización de nutrientes residuales del inóculo, reservas intracelulares o respuestas fisiológicas de adaptación al estrés, sin implicar degradación del contaminante.

Respecto a la cantidad de proteína soluble, este ha sido usado como marcador de actividad metabólica por autores como Mukherjee y Bordoloi (2012), al evaluar curvas de crecimiento con el hidrocarburo como única fuente de carbono; ya que reflejan la capacidad de respuesta ante el petróleo, en conjunto a otros indicadores como el peso de biomasa seca. Siendo en este estudio que todas las cepas y consorcios con estimulación superaron los 0.3 mg/mL de proteína soluble; y sin estímulo, sólo *P. aeruginosa* alcanzó 0.246 mg/mL valores que en el estudio de Mukherjee y Bordoloi (2012) se obtuvo a las 24 horas con cepas de *B. subtilis* y *P. aeruginosa*. Aunque también se resalta que compuestos fenólicos y propios del extracto de la cebolla pudieron generar sobreestimaciones en la cuantificación por el método de Lowry.

Los resultados evidencian que *P. aeruginosa*, pese a no haber estado expuesta a hidrocarburos, mostró alta actividad metabólica. Esto refuerza la idea de que bacterias no adaptadas pueden responder eficientemente ante petróleo crudo, como también reportaron Syuhadah y Raikhan (2022).

El consorcio C20 potenció sus indicadores metabólicos al incorporar *P. aeruginosa*, confirmando que ciertas cepas con alta actividad pueden mejorar el rendimiento, tal como Zhang el al. (2005), quienes evidenciaron el efecto positivo en la degradación al agregar a una cepa de *P. aeruginosa* o de su biosurfactante directamente; ello porque los ramnolípidos favoren la emulsificación y biodisponibilidad del hidrocabruo, efecto evaluado también por Patowary el al., (2016).

El pH del sistema también varió: disminuyó con *P. aeruginosa* (activa), lo que podría relacionarse con la producción de ácidos orgánicos, como fue reportado por Braibant-Wayens (2004), aunque otros como Mendoza y Guerrero (2015) han debatido su utilidad como indicador es debatida.

Respecto a la metodología de evaluación, la realizada en este estudio fue distinta, ya que

se evaluó la actividad del cultivo sonicado, matando a las bacterias y aislando la respuesta enzimática, mientras que otros autores como Ime et al. (2018) la miden directamente en sistemas con células vivas e hidrocarburos, lo que podría explicar las diferencias con otros estudios.

En conjunto, los resultados evidencian que la interacción bacteria–petróleo desencadena respuestas metabólicas diferenciadas según la especie y las condiciones de estimulación. *P. aeruginosa* mostró una mayor flexibilidad metabólica, con altos valores en actividad redox y lipolítica, además de acidificación del medio, lo que refleja su capacidad de responder de manera rápida y eficiente ante hidrocarburos. Por el contrario, las cepas de *Bacillus thuringiensis* presentaron respuestas más limitadas, aunque susceptibles de ser estimuladas por el extracto de cebolla, lo que sugiere que metabolitos secundarios del extracto actuaron como inductores de su metabolismo enzimático. El consorcio C20 mostró efectos positivos en actividades específicas (lipolítica y proteolítica), pero no evidenció un comportamiento sinérgico claro en la actividad redox, lo que indica que la conformación de consorcios no siempre potencia todas las funciones de forma aditiva. Asimismo, la adición de surfactantes o extractos vegetales generó tanto aumentos como disminuciones en los indicadores, lo que sugiere una posible desviación metabólica hacia el consumo de estos compuestos en lugar de los hidrocarburos. Esto resalta la importancia de considerar no solo el estímulo inicial, sino también la dirección que toma el metabolismo bacteriano bajo diferentes condiciones de estimulación.

7.2. Evaluación física de la interacción bacteria-petróleo

La evaluación física de la interacción bacteria–petróleo se planteó como un complemento a los indicadores metabólicos, ya que permite identificar efectos tempranos de emulsificación y cambios en la recuperación del contaminante. A través de observaciones visuales, extracción con solventes y cuantificación gravimétrica, fue posible detectar fenómenos asociados tanto a la producción de biosurfactantes como a la interacción directa entre células y petróleo crudo. Estos análisis aportan información sobre el grado de contacto entre los microorganismos y el hidrocarburo, más allá de la simple degradación, permitiendo explorar las limitaciones y potencialidades de los consorcios bacterianos bajo condiciones de estimulación.

La observación visual, aunque poco documentada en la literatura científica, resultó útil como indicador temprano de la interacción microorganismo–petróleo. En este estudio, *P. aeruginosa* y los consorcios bacterianos mostraron formación de micelas visibles, es decir, gotas emulsionadas de petróleo que transformaron la capa homogénea inicial en una dispersión de gotas de 0.5 a 1.5 mm, lo que indica interacción activa con el contaminante. Este fenómeno también fue reportado por Zhang el al. (2005), atribuyéndolo a la producción de ramnolípidos.

Durante la extracción con solventes orgánicos, se observó la formación de una capa blanquecina tipo "tela" y una intensa emulsificación en las fracciones obtenidas (F2 y F3), lo que sugiere interacción del petróleo con componentes celulares como restos bacterianos o metabolitos (por ejemplo, biosurfactantes). Para lograr una separación efectiva fue necesario usar diclorometano, un solvente más apolar. Pese a esta interacción física, Zhang el al. (2005) señalaron que la adsorción de petróleo crudo sobre restos celulares fue insignificante en su estudio.

La cuantificación gravimétrica mostró un porcentaje promedio de recuperación de petróleo del 35.83 ± 5.55 %, sin diferencias significativas frente al control abiótico. Sin embargo, en tratamientos con *P. aeruginosa* viva o sonicada se observó mayor recuperación aparente del petróleo, lo que sugiere que componentes celulares favorecieron la emulsión o retención del contaminante, afectando su recuperación. Esta mayor recuperación no implica necesariamente mayor degradación. Por el contrario, puede indicar que compuestos celulares facilitaron la formación de emulsiones más estables, dificultando la separación del petróleo, lo que también se ha descrito como una limitación de la técnica gravimétrica. En cambio, métodos como la cromatografía permitirían analizar la degradación específica de fracciones hidrocarbonadas, tal como lo reportaron Ordoñez el al. (2018), quienes observaron fragmentación de moléculas complejas hacia compuestos más simples.

La adición de emulsionantes (extracto de cebolla morada y Tween 80) no generó un aumento en la degradación del contaminante, pero sí incrementó la proporción de fracciones emulsionadas, lo que sugiere una mayor interacción física. Sin embargo, otros autores, como Periche y Robles (2016), reportaron que aunque el Tween 80 puede ejercer un efecto positivo en la biodegradación, en altas concentraciones podría inhibirla. Esto se explica porque los surfactantes, en concentraciones específicas, concentración micelar crítica (CMC), forman micelas y permiten la interacción y el transporte de compuestos hidrófobos, aumentando su biodisponibilidad para los microorganismos; no obstante, concentraciones excesivas pueden generar micelas demasiado estables o incluso provocar efectos tóxicos sobre las células, lo que hace necesario controlar cuidadosamente el tipo y la dosis para optimizar la biodegradación, tal como Mohanty et al. (2013). En este estudio, los surfactantes se aplicaron al 4 % (v/v), por lo que el petróleo en el cultivo pudo no haber estado disponible, al encontrarse predominantemente en la fase micelar y no biodisponible para los microorganismos.

Además, también podría explicarse que la ausencia de adaptación previa de las cepas utilizadas limitó su capacidad degradadora en el corto plazo, tal como Al-Kaabi el al. (2022) quienes observaron que la adición de *P. aeruginosa* mejoró la interacción petróleo-microorganismo, pero no siempre implicó mayor degradación.

La eficacia de la biodegradación depende de varios factores, tal como lo descrito por Ozyurek y Bilkay (2017), el metabolismo de las cepas, el tipo de hidrocarburo, las condiciones del entorno, como también de aditivos como estimulantes. Li el al. (2023) señalaron que el transporte de electrones microbianos puede ser potenciado con aditivos, acelerando la biorremediación. En cambio, otros autores como Braibant-Wayens (2004) y Ravi el al. (2022) enfatizan que lo ideal es lograr degradación solo con hidrocarburos como fuente de carbono y nutrientes inorgánicos, sin aditivos externos.
Por otro lado, Hickl y Juárez (2022), al trabajar con *Alcanivorax borkumensis*, indicaron que dispersantes químicos no mejoraron ni inhibieron la biodegradación, destacando que su efecto puede ser neutro, dependiendo de la especie microbiana.

La degradación medida por gravimetría fue baja en este estudio, posiblemente por el corto tiempo de incubación y el periodo de latencia de las cepas no adaptadas. Esto podría mejorarse con procesos de preadaptación, como los realizados por Chhatre el al. (1996), quienes redujeron la latencia bacteriana mediante enriquecimiento en catecol. Adicionalmente, la volatilidad del petróleo y el uso de solventes pueden generar pérdidas durante el proceso de extracción, afectando la precisión de la medición. A diferencia de la cromatografía, la gravimetría no permite evaluar fracciones específicas, sino solo hidrocarburos totales, lo que implica mayor variabilidad y necesidad de más réplicas para obtener datos precisos. Y aunque en la literatura no ha descrito la evaluación y cuantificación de fracciones emulsionadas, varios estudios usan distintos solventes para mejorar la eficiencia de extracción; ya que la formación de emulsiones y la presencia de biomasa o surfactantes, puede afectarla. En el presente estudio, la medición de estas fracciones separadas permitió evaluar la interacción física entre microorganismos y petróleo crudo.

Los resultados de esta fase sugieren que la interacción observada entre bacterias y petróleo crudo estuvo marcada principalmente por fenómenos físicos, como la emulsificación y la retención del contaminante, más que por una degradación detectable mediante gravimetría. La baja recuperación gravimétrica podría estar vinculada a la formación de micelas estables y a la acción de compuestos celulares o surfactantes añadidos, más que a una limitación metabólica. Este comportamiento ha sido descrito como una limitación inherente al método gravimétrico, el cual no permite distinguir entre pérdida real de hidrocarburos y emulsificación. En ese sentido, la presencia de emulsiones visibles, incluso en ausencia de un aumento de la degradación medible, puede interpretarse como un paso inicial hacia la biodisponibilidad del contaminante, lo que concuerda con trabajos que resaltan la relevancia de la interacción física previa al metabolismo.

7.3. Evaluación del petróleo por FT IR

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) ha sido utilizada en diversos estudios para evaluar la degradación de hidrocarburos, principalmente mediante la disminución de la intensidad o desaparición de picos característicos del contaminante. Por ejemplo, Wang el al. (2022) analizaron la degradación de queroseno por *Lysinibacillus sphaericus*, observando la atenuación de bandas específicas en el espectro tras el tratamiento bacteriano, como se muestra en la Figura 11.

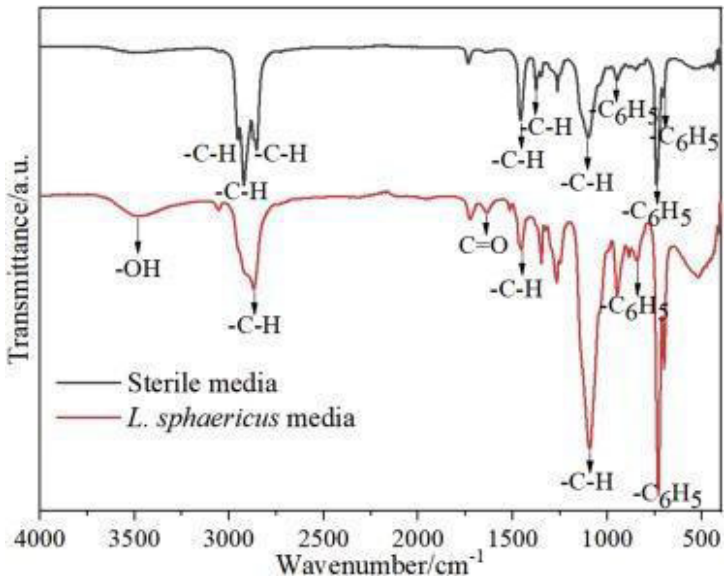


Figura 11. Comparación de interferogramas para la evaluación de degradación. Recuperado de Wang el al. (2022)

En contraste, en el presente estudio, no se evidenció degradación significativa mediante gravimetría. Por ello, el análisis FTIR se enfocó en las fracciones emulsionadas, buscando identificar interacciones fisicoquímicas entre el petróleo y los metabolitos bacterianos. En este contexto, el aumento en la intensidad o definición de los picos del espectro puede indicar una mayor cantidad de hidrocarburos retenidos o solubilizados por productos celulares, como biosurfactantes o restos de biomasa.

Comparando con el control abiótico (sin inóculo) y con *P. aeruginosa* individual, se observó que el tratamiento con el consorcio C20 más *P. aeruginosa* sonicada presentó mayor intensidad de absorción en las bandas de hidrocarburos alifáticos (2850–2950 cm^{-1}). Esto sugiere una mayor emulsificación y retención del petróleo en la fase acuosa, probablemente facilitada por productos celulares como biosurfactantes, bioemulsionantes o biomasa muerta.

Cabe señalar que, al diluir las muestras en cloroformo y diclorometano, algunos picos se observaron poco definidos, a diferencia del control sin diluir, cuyo espectro coincidió con

el interferograma típico del queroseno, tal como lo reportaron Khan el al. (2016) al evaluar estándares de queroseno, gasolina y diésel (Figura 12).

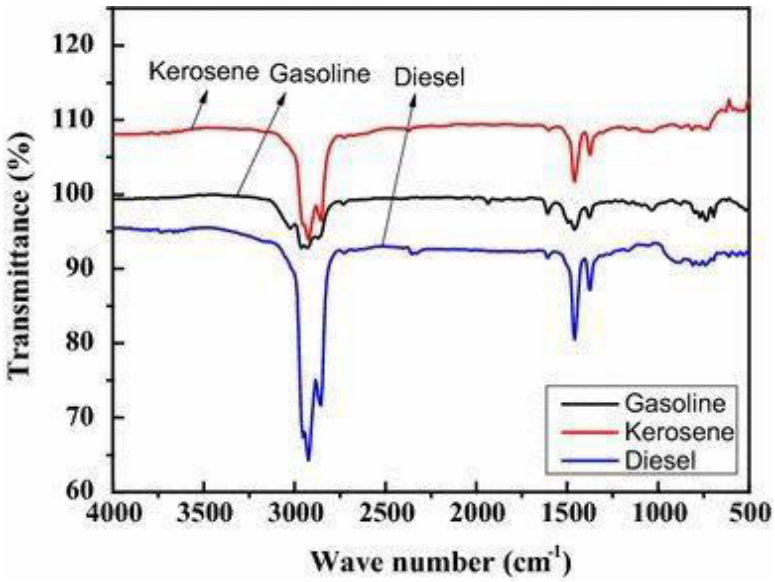


Figura 12. Comparación de interferogramas entre hidrocarburos de petróleo. Recuperado de Khan el al. (2016)

Este tipo de interacciones no implica necesariamente degradación, pero sí sugiere una mayor biodisponibilidad del contaminante, lo cual es clave para procesos posteriores de biorremediación. La evaluación continua en el tiempo podría mostrar la evolución del consorcio bacteriano y su capacidad para transformar o emulsionar el petróleo, tal como lo hicieron Al-Kaabi el al. (2022), quienes monitorearon los cambios espectrales durante 16 semanas (Figura 13).

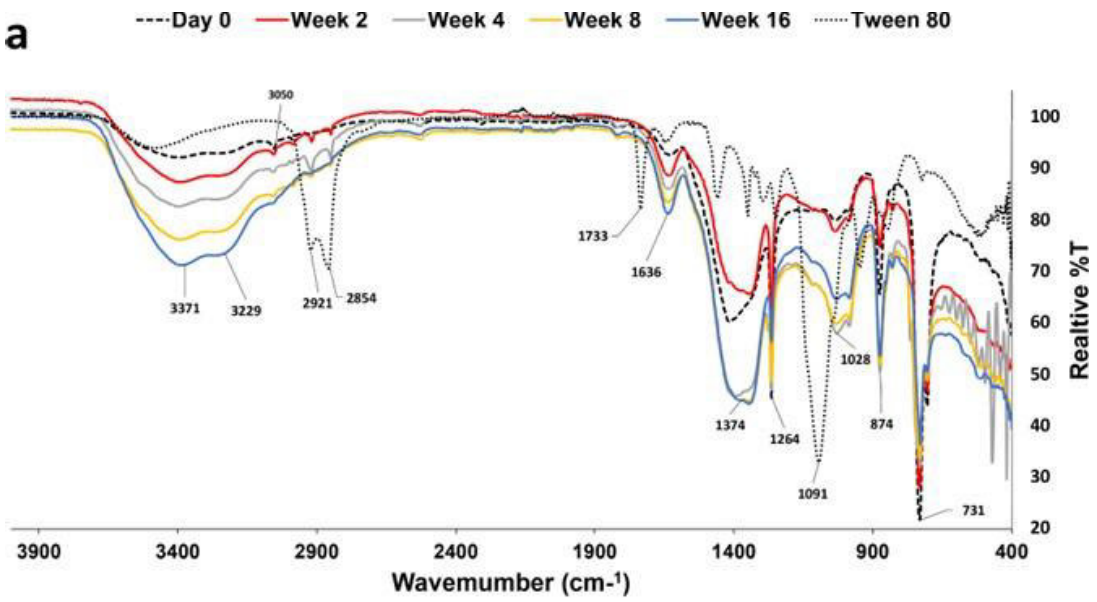


Figura 13. Comparación de interferogramas durante 8 semanas. Recuperado de Al-Kaabi el al. (2022)

Tras un derrame de hidrocarburos, los microorganismos ambientales atraviesan un proceso de selección natural, donde sobreviven aquellos capaces de adaptarse al nuevo contexto fisicoquímico, tal como D'Ugo el al. (2021) quienes asociaron un evento de contaminación con petróleo con cambios en la comunidad microbiana de agua; esto también lo reportó Jurelevicius el al. (2013), quienes observaron comunidades bacterianas enriquecidas dependiendo del ecosistema y del tipo de hidrocarburo de petróleo utilizado. En este escenario, la aplicación de nutrientes o aditivos (bioestimulación/estimulación) puede potenciar la actividad microbiana, favoreciendo procesos como la biodegradación. La evaluación metabólica y física de dicha interacción permite identificar respuestas metabólicas tempranas, incluso en bacterias no adaptadas previamente al contaminante.

Estos resultados no implican necesariamente una degradación química del petróleo, pero sí evidencian una mayor biodisponibilidad del contaminante en los tratamientos con bacterias. La evaluación a lo largo del tiempo permitiría observar si estas interacciones iniciales derivan en transformación real del hidrocarburo.

VIII. CONCLUSIONES

- La caracterización de la respuesta metabólica inicial de *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a petróleo crudo evidenció diferencias marcadas entre ambas especies, sin haber tenido un proceso de pre-adaptación, mostrando que el petróleo crudo induce cambios en el metabolismo general. *Bacillus thuringiensis* mostró actividades mucho menores, siendo la actividad redox la más elevada, aunque inferior al 50 %, lo que indica una respuesta más limitada al sistema con petróleo crudo. Por otra parte, *Pseudomonas aeruginosa* presentó alta actividad lipolítica (mayor al 100 % respecto a pancreatina) y alta actividad redox (mayor al 50 % respecto al control), reflejando una respuesta metabólica intensa ante el estrés y su adaptabilidad a la disponibilidad limitada de sustratos; aunque dichos indicadores no constituyen evidencia directa ni específica de biodegradar hidrocarburos

- La evaluación del efecto de surfactantes sobre los indicadores metabólicos de *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de petróleo crudo mostró que las respuestas son selectivas y dependen tanto del microorganismo como del aditivo empleado. En general, el extracto de *Allium cepa* y Tween 80 incrementaron la actividad proteolítica, mientras que la actividad lipolítica más alta se observó únicamente en presencia de *P. aeruginosa*, ya sea viva o sonicado, indicando que esta actividad depende principalmente de la cepa y no del estímulo externo. Estos resultados evidencian que los surfactantes pueden modular la respuesta metabólica general de las bacterias, afectando la intensidad de las actividades enzimáticas y la disponibilidad de petróleo, pero la capacidad máxima de lipasa está determinada por la actividad intrínseca de *P. aeruginosa*.

- El análisis físico del sistema de cultivo con y sin surfactantes, evidenció que tanto la presencia de bacterias como de aditivos modifican las propiedades del sistema. Se observaron cambios como emulsificación, redistribución de fases, alteraciones en la fracción recuperable por gravimetría y variaciones cualitativas en el espectro FT-IR. Los tratamientos que incluyeron surfactantes y *Pseudomonas aeruginosa* mostraron mayor fracción emulsionada y cambios más marcados en el perfil espectral, lo que indica una mayor dispersión y disponibilidad aparente del petróleo. Sin embargo, estas modificaciones corresponden principalmente a procesos físicos de emulsificación y asociación a biomasa, y no constituyen evidencia de un proceso de biodegradación del petróleo crudo.

- De manera complementaria, los resultados obtenidos confirman que la presencia de respuestas metabólicas generales no es suficiente para considerar a un microorganismo como apto para procesos de biorremediación de hidrocarburos. En este sentido, los microorganismos que no presentan actividad hidrocarburoclástica demostrable, evidenciada mediante la transformación del sustrato o la degradación del hidrocarburo, no pueden ser empleados de forma efectiva en procesos de biorremediación, aun cuando exhiban respuestas fisiológicas al estrés o modificaciones metabólicas inducidas por la presencia del petróleo crudo.

IX. RECOMENDACIONES

- Ampliar la evaluación hacia otros compuestos naturales como extractos vegetales, biosurfactantes microbianos o derivados de algas, con el fin de identificar alternativas más eficientes, económicas y sostenibles para modificar la biodisponibilidad del petróleo crudo y el comportamiento del sistema de cultivo.

- Incorporar herramientas ómicas para caracterizar los mecanismos moleculares de respuesta bacteriana frente al petróleo crudo y a los surfactantes, incluyendo la expresión génica, perfiles proteicos y metabolómicos asociados a la tolerancia y adaptación al hidrocarburo.

- Replicar los experimentos en microcosmos o mesocosmos con suelos contaminados, con el propósito de validar si los patrones observados en condiciones controladas se mantienen en sistemas ambientales complejos, especialmente en relación con emulsificación, redistribución de fases y respuesta metabólica bacteriana.

- Ampliar los indicadores fisicoquímicos del petróleo crudo mediante técnicas como GC-MS o cromatografía líquida de alta resolución, con el fin de describir con mayor detalle los cambios cualitativos en la composición del petróleo y la dinámica de sus fracciones.

- Desarrollar estudios de adaptación y enriquecimiento microbiano frente al petróleo crudo a través de cultivos secuenciales y aumentos graduales de concentración, con el fin de comprender cómo microorganismos inicialmente no preadaptados pueden ser seleccionados bajo presión ambiental hasta adquirir mayor tolerancia y capacidad de utilización del hidrocarburo.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abubakar A., Abioye P., Abiodum S., Aransiola S., Raju N. & Prasad R. (2024). Crude oil biodegradation potential of lipase produced by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hydrocarbon contaminated soil. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, Volumen 26, 26 - 32. https://doi.org/10.1016/j.enceco.2023.12.001

Adams R., ZaVala-Cruz J. & Morales-García F. (2008). Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico. II: Afectación a la fertilidad y a su recuperación. *Interciencia*, *33*(7), 483-489. Recuperado de: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442008000700005&lng=es&tlng=es.

Afrin S., Tamanna T., Shahajadi U., Jui A., Miah M. & Bhuiyan M. (2024). Characterization of protease-producing bacteria from garden soil and antagonistic activity against pathogenic bacteria. The Microbe 4 (2024), 100123. https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100123

Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades (2016). Resúmenes de Salud Pública - Hidrocarburos totales de petróleo [Total Petroleum Hydrocarbons (TPH)]. Recuperado de: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs123.html#:~:text=La%20ingesti%C3%B3n%20de%20algunos%20productos,de%20l%C3%ADquido%20hacia%20los%20pulmones.

Al-Kaabi N., Al Disi Z., A Al.Ghoti M., Solling T. & Zouari N. (2022). Interacción entre bacterias indígenas degradadoras de hidrocarburos en mezclas reconstituidas para la remediación de petróleo meteorizado en el suelo. *Biotechnology Reports*, 36 (2022) e00767. https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00767. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9562452/?utm_source=chatgpt.com

Aranzales, U. (2021). Evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburos de una colección de hongos de la Universidad de los Andes. Universidad de los Andes. Disponible en: https://hdl.handle.net/1992/53991

Bahobail A., Gad S. & Amin G. (2016). Cepas bacterianas aisladas localmente de múltiples capacidades de degradación potencial en contaminantes de hidrocarburos de petróleo. Avances en Microbiología, Vol 06, numero 11. 10.4236/aim.2016.611081. https://file.scirp.org/Html/4-2270748_70642.htm?

Bajelani, S., Enayatizamir, N., Beheshti, A., Agha, A., Sharifi, R. (2023). Potential of some microbial isolates on diesel hydrocarbons removal, bio surfactant production

and biofilm formation. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2023(21), 417–428. https://doi.org/10.1007/s40201-023-00868-9

Bekele, G. K., Gebrie, S. A., Mekonen, E., Fida, T. T., Woldesemayat, A. A., Abda, E. M., Tafesse, M., & Assefa, F. (2022). *Isolation and characterization of diesel-degrading bacteria from hydrocarbon-contaminated sites, flower farms, and soda lakes*. *International Journal of Microbiology, 2022*, Article ID 5655767, 12 pages. https://doi.org/10.1155/2022/5655767

Bekele, G., Gebrie, S., Abda, E. M., Sinshaw, G., Abebe, S. H., Worku Negie, Z., Tafesse, M. & Assefa, F. (2023). Kerosene Biodegradation by Highly Efficient Indigenous Bacteria Isolated from Hydrocarbon-Contaminated Sites. *Microbiology Insights*, 16: 1-9. 10.1177/11786361221150759.

Cao, H., Lai, Y., Bougouffa, S., Xu, Z., Yan, A. (2017). El análisis comparativo del genoma y el transcriptoma revela características superficiales distintivas y potenciales fisiológicos únicos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *BMC Genomics* 18, 459 (2017). https://doi.org/10.1186/s12864-017-3842-z. Recuperado de: https://link.springer.com/article/10.1186/s12864-017-3842-z?utm_source=chatgpt.com#citeas

Cervantes-Gonzáles, E., Salazar-Quintanilla, L. & Diaz-Flores, P. (2013). Lipasas inducidas por hidrocarburos del petróleo. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (Sup. 2) 9-15. Recuperado de: https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/36522

Chakraborty J, Jana T, Saha S & Dutta TK (2014). Ring-Hydroxylating Oxygenase database: a database of bacterial aromatic ring-hydroxylating oxygenases in the management of bioremediation and biocatalysis of aromatic compounds. *Environ. Microbiol*. Rep. 6(5):519-523. [PMID: 25646545]. http://bicresources.jcbose.ac.in/ssaha4/Rhobase/index.php

Chauhan, A., Fazlurrahman, Oakeshott, J. G., & Jain, R. K. (2008). Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian journal of microbiology*, *48*(1), 95–113. https://doi.org/10.1007/s12088-008-0010-9. Recuperado de: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3450204/pdf/12088_2008_Article_10.pdf

Curtis, J., Metheny, E., & Sergent, S. R. (2025, enero). *Toxicidad de los hidrocarburos*. En StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Recuperado de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK499883/

Daniele A., Tapizquent M., Valbuena O., Contreras L. & Wilkesman J. (2010). Caracterización de una actividad lipase termoestable alcalina excretada por *Anoxybacillus* sp. *Ciencia*, 18 (2), 100 – 107.

Dasgupta, D., Ghosh, R., & Sengupta, T. K. (2013). Biofilm-mediated enhanced crude oil degradation by newly isolated *Pseudomonas* species. *ISRN biotechnology*, *2013*, 250749. https://doi.org/10.5402/2013/250749

Das, N. & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. Biotechnology research international. 2011. 941810. 10.4061/2011/941810. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/50196642_Microbial_Degradation_of_Petroleum_Hydrocarbon_Contaminants_An_Overview

De Los Ríos C. (2021). Biorremediación bacteriana del cadmio en suelos agrícolas productores de "cacao" (*Theobroma cacao* L.) de la cooperativa agraria industrial Naranjillo, Tingo María, Huánuco. [Universidad Privada Ricardo Palma, Tesis de pregrado]. Recuperado de: https://repositorio.urp.edu.pe/handle/20.500.14138/4535?locale-attribute=en

Dollah, A., Rashid, Z., Othman, N., Che Mohamed Hussein, S., Mat Yusuf, S. & Japperi, N. (2018). Effects of Ultrasonic Waves During Waterflooding for Enhanced Oil Recovery. *International Journal of Engineering & Technology.* 7. 232. 10.14419/ijet.v7i3.11.16015. https://www.researchgate.net/publication/326700176_Effects_of_Ultrasonic_Waves_During_Waterflooding_for_Enhanced_Oil_Recovery

D'Ugo, E., Bruno, M., Mukherjee, A., Chattopadhyay, D., Giuseppetti, R., De Pace, R., & Magurano, F. (2021). Characterization of microbial response to petroleum hydrocarbon contamination in a lacustrine ecosystem. *Environmental science and pollution research international*, *28*(20), 26187–26196. https://doi.org/10.1007/s11356-021-13885-8

Dutta A. (2017). Chapter 4: Fourier Transform Infrared Spectroscopy. En Sabu Thomas, Raju Thomas, Ajesh K. Zachariah, Raghvendra Kumar Mishra, *In Micro and Nano Technologies, Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization* (pp. 73-93), Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46140-5.00004-2

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. https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2074621

Faccioli, Y. E. d. S., de Oliveira, K. W., Campos-Guerra, J. M., Converti, A., Soares da Silva, R. d. C. F., & Sarubbo, L. A. (2024). Biosurfactants: Chemical properties,

ecofriendly environmental applications, and uses in the industrial energy sector. *Energies, 17*(20), 5042. https://doi.org/10.3390/en17205042

Fundación Chile (2019). Manual de tecnologías de remediación de sitios contaminados. Recuperado de: https://fch.cl/wp-content/uploads/2019/10/manual-de-tecnologias-de-remediacion-de-sitios-contaminados_baja-1.pdf

García-Cruz, N. & Aguirre-Macedo M. (2014). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. p. 641-652. En: A.V. Botello, J. Rendón von Osten, J. A. Benítez y G. GoldBouchot (eds.). Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. uac, unam-icmyl, cinvestav-Unidad Mérida. 1210 p. isbn 978-607-7887-71-3. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/273002971_Biodegradacion_de_petroleo_por_bacterias_algunos_casos_de_estudio_en_el_Golfo_de_Mexico

García-Carreño, F. L., Dimes, L. E., & Haard, N. F. (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Analytical biochemistry, 214(1), 65–69. https://doi.org/10.1006/abio.1993.1457

Gob.pe. (2021). ¿Qué son los hidrocarburos?. https://www.gob.pe/institucion/regionpiura-drem/noticias/618469-que-son-los-hidrocarburos

Goncalves, J., Harumi, H. (2018). Proteaseas microbianas: Producción y aplicación en la obtención de hidrolizados proteicos. Food Research International, 103(2018): 253-262. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044

Gupta, N., Rathi, P., & Gupta, R. (2002). Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Analytical biochemistry*, *311*(1), 98–99. https://doi.org/10.1016/s0003-2697(02)00379-2

Habib S, Johari WLW, Shukor MY & Yasid NA. (2017). Screening of hydrocarbon- degrading bacterial isolates using the redox application of 2,6-DCPIP. Bioremediation Science and Technology Research. 5(2):13-16. https://doi.org/10.54987/bstr.v5i2.358.

Hashmat, A.J., Afzal, M., Iqbal, S. Amin, I., Arias, C., Brix, H., Zafar, I., Ríaz, S., Rehman, R., Salamatullah, A. Wondmie, G., Bourhia, M. (2024). Nutrients, surfactants, and aeration in constructed wetlands affect bacterial persistence and metabolic activity during the remediation of crude oil-contaminated water. *Bioresour. Bioprocess.* 11, 40. https://doi.org/10.1186/s40643-024-00757-5

Hanson, K.G., Desai, J.D. & Desai, A.J. (1993). A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnol. Tech.*, 7, 745-748. doi: 10.1007/BF00152624

Hernández T., Yurevna P., Bautista H., Govin A., Fernández S. & González F. (2020). Caracterización de bacterias aisladas de un yacimiento de petróleo cubano. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, (4), 115-133. https://www.executivebs.org/publishing.cl/aci/2020/Vol11/Nro4/7-ACI1369-20-full.pdf

Herrera, J. (2020). Ingeniería de la perforación de pozos de petróleo y gas. Vol. I: Origen y características de los hidrocarburos. Universidad Politécnica de Madrid. DOI: 10.20868/UPM.book.62714. Recuperado de: https://oa.upm.es/62714/1/INGENIERIA_POZOS_PETROLEO_Y_GAS_Vol-1_LM1B5T1R0-20200323.pdf

Ibrahim H. M. (2016). Biodegradation of used engine oil by novel strains of Ochrobactrum anthropi HM-1 and Citrobacter freundii HM-2 isolated from oil-contaminated soil. *3 Biotech*, *6*(2), 226. https://doi.org/10.1007/s13205-016-0540-5

Ibrar, M. & Zhang, H. (2020). Construction of a hydrocarbon-degrading consortium and characterization of two new lipopeptides biosurfactants. *The Science of the total environment*, *714*, 136400. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136400

Ime JI, Alphonsus IA, Saturday AP, Godwin BM, Utibe EC & Umoren E.A. (2018). Screening for hydrocarbon degrading bacteria using redox indicator 2,6-dichlorophenol indophenol. Chemical and Biomolecular Engineering. 3(2):11-16. https://doi.org/10.11648/j.cbe.20180302.11.

Irabor, Afona & Mmbaga, M. (2017). Evaluation of Selected Bacterial Endophytes for Biocontrol Potential against Phytophthora Blight of Bell Pepper (Capsicum annuum L.). *Journal of Plant Pathology & Microbiology*. 08. 10.4172/2157-7471.1000424. https://www.researchgate.net/publication/321189563_Evaluation_of_Selected_Bacterial_Endophytes_for_Biocontrol_Potential_against_Phytophthora_Blight_of_Bell_Pepper_Capsicum_annuum_L

Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS microbiology reviews*, *15*(1), 29–63. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00121.x

Jiang Y., Qi H. & Zhang X. (2016). Novel method for separation and screening of lubricant-degrading microorganisms and bacterial biodegradation. Chinese Journal of Chemical Engineering, Volume 24, Issue 3, Pages 353-359, ISSN 1004-9541. https://doi.org/10.1016/j.cjche.2015.11.001

Jurelevicius, D., Alvarez, V. M., Marques, J. M., de Sousa Lima, L. R., Dias, F.deA., & Seldin, L. (2013). Bacterial community response to petroleum hydrocarbon amendments in freshwater, marine, and hypersaline water-containing microcosms. *Applied and environmental microbiology*, *79*(19), 5927–5935. https://doi.org/10.1128/AEM.02251-13.

Khan, M. S., Inamullah, Sohail, M. & Khattak, N. (2016). Conversion of Mixed Low-Density Polyethylene Wastes into Liquid Fuel by Novel CaO/SiO2 Catalyst. *Journal of Polymers and the Environment*. 24. 10.1007/s10924-016-0768-5. https://www.researchgate.net/publication/301904739_Conversion_of_Mixed_Low-Density_Polyethylene_Wastes_into_Liquid_Fuel_by_Novel_CaOSiO2_Catalyst

Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Hazen, T. C. & Huettel, M. (2011). Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Applied and environmental microbiology*, *77*(22), 7962–7974. https://doi.org/10.1128/AEM.05402-11. Recuperado de: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3208977/

León A. & Zúñiga M. (2020). La sombra del petróleo: Informe de los derrames petroleros en la Amazonía peruana entre el 2000 y el 2019. Recuperado de: https://oi-files-cng-prod.s3.amazonaws.com/peru.oxfam.org/s3fs-public/file_attachments/La-sombra-del-petroleo-esp.pdf

León A. & Zúñiga M. (2022). La sombra de los hidrocarburos en el Perú. Actualización de la información sobre sitios con daño hidrocarburífero en el Perú: 1997-2021. Recuperado de: https://oi-files-cng-prod.s3.amazonaws.com/peru.oxfam.org/s3fs-public/file_attachments/La-sombra-de-los-hidrocarburos-en-el-Peru%CC%81.pdf

Li C., Changzheng C., Zhang J., Shen J., Baoyan H., Long Y. & Ye J. (2023). Biodegradation of petroleum hydrocarbons based pollutants in contaminated soil by exogenous effective microorganisms and indigenous microbiome. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 253, 114673. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014765132300177X

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, *193*(1), 265–275.L. PMID: 14907713

Iyobosa, E., Fang, Z. S., Jun, N. H., Jiehao, S. & Gang, M. X. (2021). Development of a robust bacterial consortium for petroleum hydrocarbon degradation. Fresenius Environmental Bulletin. 30(3):2356-2367. https://www.researchgate.net/publication/350798443_DEVELOPMENT_OF_A_ROBUST

_BACTERIAL_CONSORTIUM_FOR_PETROLEUM_HYDROCARBON_DEGRADATION

Makut, Makwin & Ishaya, P. (2010). Bacterial species associated with soils contaminated with used petroleum products in Keffi town, Nigeria. African Journal of Microbiology Research. 4.https://www.researchgate.net/publication/268358522_Bacterial_species_associated_with_soils_contaminated_with_used_petroleum_products_in_Keffi_town_Nigeria

Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. (2007). El petróleo. [Visitado el 10.02.2024]. Recuperado de: https://www.midagri.gob.pe/portal/datero/45-sector-agrario/recurso-energetico/339-el-petroleo

Ministerio de Desarrollo e inclusión social. (2022). Con acción multisectorial articulada el Gobierno atiende desastre ambiental por derrame de petróleo. Recuperado de: https://www.gob.pe/institucion/midis/noticias/633314-con-accion-multisectorial-articulada-el-gobierno-atiende-desastre-ambiental-por-derrame-de-petroleo

Ministerio de Energía y Minas. (2023). Inventario de Pasivos Ambientales Subsector Hidrocarburos: Sexta actualización. Recuperado de: https://www.minem.gob.pe/_detalle.php?idSector=22&idTitular=8884&idMenu=sub8883&idCateg=1635

Ministerio de Energía y Minas. (2023). Hidrocarburos: Abril 2023 (Cifras preliminares). Revista estadística "*En Cifras*". https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/4710391/Estad%C3%ADstica%20Subsector%20Hidrocarburos%20abril%202023.pdf?v=1687303657

Ministerio de Energía y Minas (2022). Balance Nacional de Energía. Dirección General de Eficiencia Energética. Lima, Perú. Recuperado de: https://www.minem.gob.pe/_publicacion.php?idSector=12&idPublicacion=65

Mohanty, S., Jublee, J. Mukherji, S. (2013). Practical Considerations and Challenges Involved in Surfactant Enhanced Bioremediation of Oil. *Investigación BioMed Internacional*, 2013(1). https://doi.org/10.1155/2013/328608. Recuperado de: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2013/328608?utm_source=chatgpt.com

Morales A. (2008). Cinética de crecimiento de un organismo productor de enzima metil paration hidrolasa. [Universidad de Sonora, Tesis de maestría] Recuperado de: http://www.repositorioinstitucional.uson.mx/bitstream/20.500.12984/217/1/moralesortegaadrianam.pdf

Mukherjee, A. K., & Bordoloi, N. K. (2012). Biodegradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) in liquid culture and in soil by Bacillus subtilis and *Pseudomonas aeruginosa* strains and a formulated bacterial consortium. *Environmental science and pollution research international*, *19*(8), 3380–3388. https://doi.org/10.1007/s11356-012-0862-8

Nanekar RD & Kokitkar SS (2024) Enzyme Profiling of Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria Isolated from Oil Contaminated Soils. Indian Journal of Science and Technology 17(23): 2412-2420. https://doi.org/10.17485/IJST/v17i23.642

Obire O. (2001). Biodegradation of Refined Petroleum Hydrocarbons in Soil. J. Appl. Sci. Environ. Mgt. 5(1): 43-46. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/257526982_Biodegradation_of_Refined_Petroleum_Hydrocarbons_in_Soil_J_Appl_Sci_Environ_Mgt_51_43-46#fullTextFileContent

Ordoñez D., Abella C., Echevarry A., Paz L. & Benítez-Campo N. (2018). Biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados por microorganismos aislados de suelo contaminado con derivados del petróleo. Revista de Ciencias. 22. 10.25100/rc.v22i2.7917. https://www.researchgate.net/publication/335462181_Biodegradacion_de_hidrocarburos_alifaticos_saturados_por_microorganismos_aislados_de_suelo_contaminado_con_derivados_del_petroleo

Osman E. (2022). *Practice 31 - Analysis of milk and milk products*. En Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments (pp. 327–349). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91651-6.00027-6. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323916516000276

Ossai, I., Ahmed, A., Hassan, A., & Hamid, F. (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology and Innovation*, *17*. https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526

Owens Coastal Consultants. (2013). Oil Spills, Shoreline Response and SCAT. Recuperado de: http://www.shorelinescat.com/Documents/Manuals/Generic_GOM_2013_COURSE_NOTES__full_set.pdf

Ozyurek, S. B. & Bilkay, I. S. (2017). Determination of petroleum biodegradation by bacteria isolated from drilling fluid, waste mud pit and crude oil. *Turk J Biochem*. 42:(6), 609-616. https://doi.org/10.1515/tjb-2017-0087

Patiño, O., Robles, H., & León, L. (2021). Biodegradación de petróleo por *Bacillus thuringiensis* como alternativa para la recuperación de suelos agrícolas. *Arnaldoa, 28*(2), 339–348. https://doi.org/10.22497/arnaldoa.282.28205

Pariona-Velarde, D., Bandan Cortez, L. M., Vilca Ramírez, K., & Sánchez Rojas, T. (2024). *Biosurfactante vegetal presente en extractos de cebolla morada*. Trabajo presentado en el 1er Foro Nacional de Divulgación de Ingeniería y Desarrollo Sustentable (1er FONADIDES-2024). https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29842.16329. https://www.researchgate.net/publication/383273835

Patowary K, Patowary R, Kalita MC and Deka S (2016) Development of an Efficient Bacterial Consortium for the Potential Remediation of Hydrocarbons from Contaminated Sites. *Front. Microbiol*. 7:1092. doi: 10.3389/fmicb.2016.01092

Pedroza-Padilla C., Romero-Tabarez M. & Orduz S. (2017). Actividad lipolítica de microorganismos aislados de aguas residuales contaminadas con grasas. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*: Vol 15 No. 1 (36-44) Enero_Junio 2017. doi: http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)36-44

Peralta R., Peralta T. & Ordinola-Zapata A. (2021). Caracterización de cepas de *Vibrio* spp. biorremediadoras de petróleo aisladas de agua marina. *Manglar,* 18(1): 21-26. DOI: http://dx.doi.org/10.17268/manglar.2021.003 Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/350410538_Characterization_of_oil_bioremediating_strains_of_Vibrio_spp_isolated_from_seawater

Periche, D., & Robles, H. (2016). Efecto de las concentraciones del surfactante Polioxietileno (20) Monooleato de sorbitán "Tween 80" en la biodegradación de petróleo Diesel II en suelo por *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 36(1): 10 – 18. Recuperado de: https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/1309

Pucci, G., Acuña, A., Tonin, N., Tiedemann, M., & Pucci, O. (2010). Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa de Caleta Córdova, Argentina. *Revista Peruana de Biología*, *17*(2), 237-244. Recuperado en 29 de julio de 2024, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332010000200015&lng=es&tlng=es.

Qin X., Tang J., Li D. & Zhang Q. (2012). Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline-alkaline soil. Lett. Appl. Microbiol., 55, pp. 210-217. https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2012.03280.x. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22725670/

Ranjbar, A., Mohammadzadeh, A. (2025). Isolation and Identification of Phenanthrene-Degrading Bacteria from Crude Oil-Contaminated Soils around Assaluyeh Refinery: Growth Evaluation and HPLC-Based Degradation Analysis. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis* ,99-102. https://doi.org/10.52711/2231-5675.2025.00016

Ravi A., Ravuri M., Krishnan R., Narenkumar J., Anu K., Alsalhi M., Devanesan S., Kamala-Kannan S. & Rajasekar A. (2022). Characterization of petroleum degrading bacteria and its optimization conditions on effective utilization of petroleum hydrocarbons. *Microbiological Research*, 265 (2022), 127184. https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127184

Rehman R., Ishtiaq Ali M., 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, 12676. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126276

Sagar, N., Pareek, S., Benkeblia, N., Xiao, J. (2022). Bioactivos de la cebolla (Allium cepa L.): química, funciones farmacoterapéuticas y aplicaciones industriales. *Journal of Food Sc,* 3(3), 380 – 412. https://doi.org/10.1002/fft2.135

Sánchez, T., León, J., Woolcott, J., & Arauco, K. (2004). Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. *Revista Peruana de Biología*, *11*(2), 179-186. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332004000200010&lng=es&tlng=es.

Snellman, E., Colwell, R. (2004). *Acinetobacter* lipases: molecular biology, biochemical properties and biotechnological potential. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(9): 391–400. https://doi.org/10.1007/s10295-004-0167-0

Speight J. (2002). Petroleum analysis. *Handbook of Petroleum Product Analysis.* (pp. 1 - 26). Wiley-Interscience. ISBN: 9780471203469,0471203467

Surajit Das. (2014). Microbial biodegradation and bioremediation. ISBN 978-0-12-800021-2. Elsevier

Syuhadah B. & Raikhan N. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* NR.22 – local hydrocarbon degrader species originated from crude oil non-exploration site: isolation, survivability and hydrocarbon degradation study. *Desalination and Water Treatment*, 257 (2022) 260–269. https://doi.org/10.5004/dwt.2022.28473

Thakur, S., Singh, A., Sharma, R., Aurora, R., & Jain, S. K. (2020). Biosurfactants as a novel additive in pharmaceutical formulations: Current trends and future implications. *Current Drug Metabolism, 21*(11), 1–10. https://doi.org/10.2174/1389200221666201008143238

Tarafdar, A. and Sinha, A., & Masto, R.E. (2017). Biodegradation of anthracene by a newly isolated bacterial strain, Bacillus thuringiensis AT.ISM.1, isolated from a fly ash

deposition site. *Letters in Applied Microbiology*, 2017(4), 327-334. doi: 10.1111/lam.12785.https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1090934361

Tirado-Torres D., Acevedo-Sandoval O., Romo-Gómez C., Marmolejo-Santillán Y. & Gayosso-Canales M. (2015). Participación de consorcios microbianos en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Revista Iberoamericana de Ciencias, Vol. 2 No. 3. ISSN 2334-2501. Recuperado de: http://www.reibci.org/publicados/2015/mayo/1000101.pdf

Van Der Linden, A.C. & Van Ravenswaay Claasen, J.C. (1971). Hydrophobic enzymes in hydrocarbon degradation. *Lipids* **6**, 437–443 (1971). https://doi.org/10.1007/BF02531225

Wang S., Zhao X., Rong H., Wang X., Yang J., Ding R., Fan W. & Zhang Y. (2022). Role of *Lysinibacillus sphaericus* on aviation kerosene degradation and corrosion of 7B04 aluminum alloy. *Journal of Materials Research and Technology.* Volume 18, Pages 2641-2653, ISSN 2238-7854. https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2022.03.148. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2238785422004549?via%3Dihub

Whyte, L. G., Smits, T. H., Labbé, D., Witholt, B., Greer, C. W., & van Beilen, J. B. (2002). Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in Rhodococcus strains Q15 and NRRL B-16531. *Applied and environmental microbiology*, *68*(12), 5933–5942. https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5933-5942.2002

Xue, S. W., Huang, C., Tian, Y. X., Li, Y. B., Li, J., & Ma, Y. L. (2020). Synergistic Effect of Rhamnolipids and Inoculation on the Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soils by Bacterial Consortia. *Current microbiology*, *77*(6), 997–1005. https://doi.org/10.1007/s00284-020-01899-3

Yang, M., Cao, Z., Zhang, Y. & Wu, H. (2019). Deciphering the biodegradation of petroleum hydrocarbons using FTIR spectroscopy: Application to contaminated site. https://doi.org/10.2166/wst.2019.375. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31850883/

Zhang, G. L., Wu, Y. T., Qian, X. P., & Meng, Q. (2005). Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, *6*(8), 725–730. https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0725

XI. ANEXOS

Anexo 1

Proceso gráfico de extracción y evaluación de degradación del petróleo

