



UNAP



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**OBTENCIÓN DE TRES CONSORCIOS MICROBIANOS DE SUELOS DE
UN BOSQUE PRIMARIO Y COMPARACIÓN DE SUS CAPACIDADES DE
BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS, REGIÓN LORETO**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO**

**PRESENTADO POR:
PEDRO CESAR VELA DEL ÁGUILA**

ASESORES:
Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.
Blgo. HICLER NAPOLEÓN RODRÍGUEZ MASHACURI, MSc.

IQUITOS, PERÚ

2024

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 025-CGT-UNAP-2024

En la ciudad de Iquitos, Departamento de Loreto, mediante sala presencial, a los 15 días del mes de noviembre del 2024, a las 17:00 horas se dio inicio a la sustentación pública de la tesis titulada: "OBTENCIÓN DE TRES CONSORCIOS MICROBIANOS DE SUELOS DE UN BOSQUE PRIMARIO Y COMPARACIÓN DE SUS CAPACIDADES DE BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS, REGIÓN LORETO", presentado por el bachiller PEDRO CESAR VELA DEL ÁGUILA, autorizada mediante RESOLUCIÓN DECANAL N°489-2024-FCB-UNAP, para optar el Título Profesional de **BIÓLOGO**, que otorga la UNAP de acuerdo a Ley 30220, su Estatuto y el Reglamento de Grados y Títulos vigente.

El Jurado Calificador y Dictaminador designado mediante RESOLUCIÓN DECANAL N°355-2024-FCB-UNAP, de fecha 31 de julio de 2024, integrado por los siguientes Profesionales:

- Blgo. FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, Dr. - Presidente
- Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr. - Miembro
- Blgo. ROMMEL ROBERTO ROJAS ZAMORA, Dr. - Miembro



Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas, las cuales fueron absueltas:


SATISFACTORIAMENTE

El Jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública y la Tesis han sido APROBADA con la calificación MUY BUENA estando el Bachiller apto para obtener el Título Profesional de **BIÓLOGO**.



Siendo las 18:00 horas se dio por terminado el acto de sustentación.


Blgo. FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, Dr.
Presidente


Blgo. ROMMEL ROBERTO ROJAS ZAMORA, Dr.
Miembro


Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr.
Miembro


Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.
Asesor


Blgo. HICLER NAPOLEÓN RODRÍGUEZ MASHACURI M.Sc.
Asesor

JURADOS Y ASESORES



Blgo. FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, Dr.

Presidente



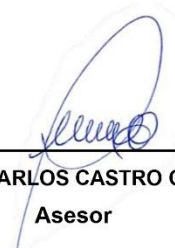
Blgo. ROMMEL ROBERTO ROJAS ZAMORA, Dr.

Miembro



Blgo. JORGE LUÍS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr.

Miembro



Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.
Asesor



Blgo. HICLER NAPOLEÓN RODRÍGUEZ MASHACURI, M.Sc.
Asesor

RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD






13% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 12%  Fuentes de Internet
- 3%  Publicaciones
- 4%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.



DEDICATORIA

A Dios, por la vida y la salud en situaciones difíciles, a mis padres Carmela y Pedro por el apoyo incondicional, la motivación y paciencia.

AGRADECIMIENTO

A la Unidad Especializada del Laboratorio de Investigación de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonía - UNAP, por proporcionarme sus instalaciones, equipos y materiales para el desarrollo de la tesis.

A la Universidad Científica del Perú por el acceso al área de concesión para la conservación de la cuenca alta, río Itaya (CCCARI) para la colecta de las muestras de suelo, y por brindarnos las facilidades para el uso de los equipos del Laboratorio de biotecnología y bioenergética, bajo la responsabilidad de la Dra. Marianela Cobos Ruiz.

A mis asesores, Juan Carlos Castro Gómez y Hicler Napoleón Rodríguez Mashacuri, por guiarme en la presente tesis y brindarme sus conocimientos en cada procedimiento, y por los consejos tan valiosos para mi crecimiento profesional.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Marjorie Del Aguila, Levi Estela, Remy Rodríguez, Gabriela Ríos, Diego Gonzales, entre otros, por el apoyo brindado en las distintas etapas de la presente tesis.

A mis maestros, Jorge Luis Marapara y Pedro Marcelino Adrianzen, por sus apoyo y consejos brindados en cada momento.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
PORTADA	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN	ii
JURADOS Y ASESORES	iii
RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Bases teóricas	6
1.3 Definición de términos básicos	11
CAPITULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES	12
2.1. Formulación de la hipótesis	12
2.2. Variables y definiciones operacionales	13
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	14
3.1. Diseño metodológico	14
3.2. Diseño muestral	14
3.2.1. Población de estudio	14
3.2.2. Tamaño de la población de estudio	14
3.2.3. Muestreo o selección de la muestra	14
3.2.4. Criterios de selección	14

3.3. Procedimientos de recolección de datos	15
3.3.1. Técnicas de colecta de muestra	15
3.3.2. Obtención y cultivo de consorcios microbianos	15
3.3.3. Crecimiento de los cultivos	16
3.3.4. Verificación de bacterias y levaduras	16
3.3.5. Purificación y amplificación del ADN metagenómico	16
3.3.6. Biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	17
3.3.7. Procesamiento y análisis de datos	17
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	18
4.1. Obtención y evaluación del perfil de crecimiento de tres consorcios microbianos	18
4.2. Verificación de presencia microbiana en los consorcios	19
4.3. Capacidad biodegradadora de HAPs de los tres consorcios microbianos obtenidos.	21
CAPITULO V : DISCUSIÓN	23
5.1. Obtención y evaluación del perfil de crecimiento de tres consorcios microbianos	23
5.2. Verificación de la presencia de bacterias y hongos en los consorcios microbianos	24
5.3. Capacidad biodegradadora de HAPs de los consorcios microbianos	25
CAPITULO VI: CONCLUSIONES	27
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	28
CAPÍTULO VIII : FUENTES DE INFORMACIÓN	29
ANEXOS	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Perfil de crecimiento de los consorcios microbianos cultivados en medio Bushnell Haas enriquecidos con HAPs (50mg/L) durante 30 días.	19
Figura 2: Verificación de presencia de microorganismos en los consorcios microbianos enriquecidos con HAPs. A. Tinción Gram, B. Tinción con bromuro de etidio, C. Tinción azul de Lactofenol.	20
Figura3: Análisis espectrofotométrico y electroforético de ADN metagenómico, y producto de amplificación del ADN metagenómico por PCR. A) Espectrofotometría de ADNm B). Electroforesis de ADNm y C). Electroforesis del producto de PCR del ADNm.	21

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Concentración de polifenoles totales de los consorcios microbianos enriquecidos con HAPs como única fuente de carbono y energía.	22

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Flujograma resumido de procedimientos realizados	36
Anexo 2: Obtención y cultivo de consorcios microbianos	37
Anexo 3: Curva de calibración de polifenoles totales	38

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son motivo de gran preocupación pública debido a sus efectos nocivos para el ambiente y la salud humana, es por ello, el interés en la obtención de consorcios compuestos por especies diferentes de microorganismos degradadores de HAPs. El objetivo general de la presente investigación fue obtener tres consorcios microbianos de suelos de un bosque primario y comparar sus capacidades de biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Para ello, primero se cultivaron las muestras durante 10 días en medio Bushnell Haas (BH) con 1% de petróleo. Luego, se cultivaron durante 30 días en medio BH con HAPs, realizando subcultivos cada 10 días. El crecimiento microbiano se evaluó midiendo la densidad óptica a 600 nm, y se verificó la presencia de microorganismos mediante la tinción Gram, tinción con bromuro de etidio y tinción con azul de lactofenol. Además, se realizó la purificación del ADN metagenómico (ADNm), seguido de análisis espectrofotométrico y electroforético. Posteriormente, se amplificó el ADNm mediante PCR. Finalmente, se determinó la capacidad biodegradadora de los consorcios midiendo el contenido de polifenoles totales (TP). Se obtuvieron tres consorcios microbianos biodegradadores de HAPs, conformados por cocos, bacilos y cocobacilos Gram positivos y negativos, y levaduras. También se obtuvo ADNm de buena calidad, cantidad e integridad, y se logró una amplificación exitosa por PCR. Finalmente, se compararon las capacidades de biodegradación de los tres consorcios microbianos. En conclusión, se logró obtener tres consorcios microbianos, la evaluación de su crecimiento y capacidades de biodegradación empleando HAPs.

Palabras clave: ADN metagenómico, consorcios microbianos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, petróleo, polifenoles

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a cause of great public concern due to their harmful effects on the environment and human health, which is why there is interest in obtaining consortia composed of different species of PAH-degrading microorganisms. The general objective of this research was to obtain three microbial consortia from soils of a primary forest and compare their capacities for biodegrading polycyclic aromatic hydrocarbons. To do this, the samples were first cultured for 10 days in Bushnell Haas (BH) medium with 1% petroleum. Then, they were cultured for 30 days in BH medium with PAHs, performing subcultures every 10 days. Microbial growth was evaluated by measuring the optical density at 600 nm, and the presence of microorganisms was verified by Gram staining, ethidium bromide staining, and lactophenol blue staining. In addition, metagenomic DNA (mDNA) was purified, followed by spectrophotometric and electrophoretic analysis. Subsequently, mDNA was amplified by PCR. Finally, the biodegrading capacity of the consortia was determined by measuring the total polyphenol (TP) content. Three PAH biodegrading microbial consortia were obtained, consisting of Gram-positive and -negative cocci, bacilli, coccobacilli, and yeasts. Good quality, quantity, and integrity mDNA was also obtained, and successful PCR amplification was achieved. Finally, the biodegradation capacities of the three microbial consortia were compared. In conclusion, three microbial consortia were obtained, and their growth and biodegradation capacities using PAHs were evaluated.

Keywords: Metagenomic DNA, microbial consortia, polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, polyphenols.

INTRODUCCIÓN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son contaminantes orgánicos, formados por dos o más anillos aromáticos fusionados ⁽¹⁻³⁾ y un sistema de enlaces dobles hidrófobos y lipófilos ⁽⁴⁾, tienen una baja solubilidad en el agua, altos puntos de fusión, ebullición y baja presión de vapor ⁽⁵⁾. Estos contaminantes se producen por combustión incompleta y pirólisis de materia orgánica ^(6,7), y tanto las fuentes naturales como las antropogénicas contribuyen a la liberación de HAPs al medio ambiente ^(1,8), donde su exposición ocurre por respiración, ingestión y absorción dérmica, y son absorbidos rápidamente en el tracto gastrointestinal de los mamíferos ⁽⁹⁾. En tal sentido, las investigaciones corroboran la capacidad tóxica, mutagénica, cancerígenos, teratogénicos y inmunotoxicogénico a diversas formas de vida ^(2,8), y se han informado casos de cáncer de pulmón, intestino, páncreas y de la piel ⁽⁹⁾, generando una gran preocupación por su presencia en todos los componentes del medio ambiente, debido a que son bioacumulables y por su resistencia a la biodegradación ⁽²⁾. Aunque son principales contaminantes del aire, sin embargo, el suelo actúa como depósito final y el principal reservorio ⁽¹⁰⁾. Ante ello, existe una alerta mundial en la comunidad científica, debido a sus efectos adversos para los seres humanos y la salud ecológica ⁽⁸⁾.

Por tanto, en la Amazonia Peruana se han reportado altas concentraciones de HAPs, donde la concentración de fluoreno es 1066 veces más alta del límite, la de fenantreno 125 veces más, la de pireno 47 y la de criseno 67 veces más alta del límite ⁽¹¹⁾, además, también hay reportes que se han vertido miles de barriles de petróleo crudo a los ríos y suelos amazónicos, causando gran repercusión en los ecosistemas terrestres y acuáticos, y las comunidades aledañas ⁽¹²⁾, siendo un problema muy grave que requiere de estrategias adecuadas y efectivas. Existen diferentes métodos de remediación convencionales que involucran enfoques físicos-químicos ⁽⁸⁾, sin embargo, estos métodos no son muy eficientes y presentan limitaciones en su aplicación, como el transporte de contaminantes de un lugar a otro en lugar de eliminarlos, la generación de subproductos tóxicos que requieren tratamiento secundario y gastos adicionales, es por ello, la necesidad de

explorar alternativas de remediación más eficientes ^(13,14).

Ante ello, surgen algunas alternativas de solución, por ejemplo, los enfoques de biorremediación basados en el uso de consorcios microbianos, ampliamente aceptada como una tecnología de tratamiento eficiente y sostenible para la restauración ecológica de suelos contaminados con HAPs ^(5,8), el cual se ha demostrado que las bacterias y hongos tienen capacidades catabólicas que podría utilizarse para la remediación ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾, desarrollando mecanismos que permiten resistir o tolerar altas concentraciones de HAPs y transformarlo en productos no peligrosos ⁽¹⁸⁾. Estos consorcios microbianos se caracterizan por tener alta diversidad, persistencia y una fuerte capacidad degradadora de HAPs ⁽¹⁹⁾, debido a que está compuesto por diferentes especies de microorganismos que utilizan y metabolizan los HAPs como fuente de energía y carbono ⁽¹³⁾. Así mismo, los degradadores microbianos pueden aumentar la biodisponibilidad de HAPs a través de la secreción de biosurfactantes: moléculas que contienen una región hidrófoba y una región hidrófila. Estas moléculas reducen la tensión interfacial y superficial en el medio de crecimiento y también forman emulsiones estables. Las emulsiones aumentan la solubilidad de los HAPs y, en consecuencia, promueven la biodisponibilidad de dichos químicos en el medio ambiente ⁽²⁰⁾. De manera que, la obtención de consorcios microbianos que metabolicen HAPs, es crucial para desarrollar posteriores aplicaciones biotecnológicas y resolver problemas de contaminación en los suelos amazónicos.

Por lo tanto, el objetivo general de la presente investigación fue obtener tres consorcios microbianos de suelos de un bosque primario y comparar sus capacidades de biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, y los objetivos específicos fueron: 1) obtener tres consorcios microbianos de suelos de un bosque primario y evaluar su crecimiento empleando como única fuente de carbono y energía hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), 2) Verificar la presencia de bacterias y hongos en los consorcios microbianos obtenidos mediante análisis microscópicos y moleculares, 3) Determinar la capacidad biodegradadora de HAPs de los tres consorcios microbianos obtenidos mediante análisis de polifenoles totales producidos.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

En 2019 en Sudáfrica, investigaron el enriquecimiento aeróbico y anaeróbico en la degradación de hidrocarburos del suelo. Los cultivos de enriquecimiento aeróbico se cultivaron en medio Bushnell Haas, asimismo, los cultivos para el enriquecimiento inicial microorganismos anaeróbicos incluyeron el medio BTEX de sales minerales, Bushnell Haas, un medio metanogénico, un medio reductor de sulfato y un medio reductor de nitrato. Se realizó el análisis de secuencia con el ARNr 16S. En su mayoría se observaron bacilos Gram negativos en los cultivos de enriquecimiento a los 25 °C en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. Los resultados de secuencias del gen 16S ARNr mostró diferentes poblaciones microbianas que podrían surgir a medida que cambian los factores ambientales, además, el análisis de la diversidad microbiana también destaca el papel de las bacterias anaerobias facultativas como *Pseudomonas* spp. y *Citrobacter* spp. en el mantenimiento de la degradación de hidrocarburos. En conclusión, los microorganismos capaces de sobrevivir tanto en condiciones óxicas como anóxicas (aeróbicas y anaeróbicas) fueron los más cruciales para la degradación a largo plazo de los hidrocarburos en el medio ambiente ⁽²¹⁾.

En 2018 (Brasil), se investigó la diversidad microbiana y los consorcios obtenidos por enriquecimiento en presencia de petróleo, donde se utilizaron enfoques metagenómicos, definidos como análisis del genoma microbiano colectivo, además, utilizaron dos medios de cultivos iniciales (caldo de lisogenia y extracto de levadura peptona dextrosa) y el medio Bushnell Haas (BH) para enriquecimiento de los consorcios. Se obtuvieron dos consorcios independientes, denominados consorcio L (pre-enriquecido en el medio LB) y consorcio Y (pre-enriquecido en el medio YPD). El filo predominante fue Proteobacteria (37,93%), seguido de Bacteroidetes (21,75%), Actinobacteria (17,37%) y Euryarchaeota (6,80%) en los cortes de perforación, mientras que Firmicutes (consorcio L 80,21% y consorcio Y 78,5%) y Proteobacteria (consorcio L 9,17% y consorcio Y 10,68%) fueron más abundantes en los consorcios. En conclusión, el enriquecimiento de los

consorcios a partir de recortes de perforación en diferentes medios de cultivo que contienen aceite aseguró el mantenimiento de géneros esenciales ⁽²²⁾.

En 2018 en Perú, se investigó la degradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos que fueron aislados de suelo contaminado. Estos hongos filamentosos fueron enriquecidos en medio Bushnell Haas con 1% de petróleo crudo como fuente de carbono y energía, se identificaron por cultivos monospóricos, y determinaron su concentración mediante recuento de células en cámara Neubauer. Se logró obtener 221 aislados, y se identificaron 14 géneros, siendo los más frecuentes, *Aspergillus* (20,8%), *Cunninghamella* (12,6%) *Penicillium* y *Paecilomyces* (10,8%), seguidos de *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Periconia*, *Fusarium*, *Bipolaris*, *Monilia* y *Cladosporium* (8,5 a 2,7%). Los géneros menos frecuentes fueron *Gliocladium*, *Memnoniella* y *Helminthosporium* (2,2%). En conclusión, se aislaron hongos hidrocarbonoclasticos, destacando *Aspergillus* sp. HP-031 por la mayor eficiencia en la biodegradación ⁽²³⁾.

En 2016 en Serbia, se investigó la degradación microbiana inicial de hidrocarburos aromáticos policíclicos, donde se aisló bacterias de un suelo contaminado por derivados de petróleo y se identificaron mediante análisis de rDNA 16S, además, se midió la capacidad de degradación de dichas bacterias utilizando el ensayo de 2,6-diclorofenolindofenol, análisis gravimétrico y cromatográfico de gases. Se logró 8 aislamientos bacterianos, de los cuales estos eran miembros de los géneros *Planomicrobium*, *Planococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Rhodococcus*, de estos aislamientos casi todos pudieron degradar dibenzotiofeno, mientras que el tolueno fue degradado por un solo microorganismo, *Planomicrobium* sp. RNP01 y *Rhodococcus* sp. RNP05 mostraron el mayor potencial de degradación de los hidrocarburos examinados. En conclusión, las dos bacterias aisladas y caracterizadas, *Planomicrobium* sp. RNP01 y *Rhodococcus* sp. RNP05, tienen un alto potencial de biorremediación y es probable que se utilicen para la degradación de HAPs altamente tóxicos en áreas contaminadas ⁽²⁴⁾.

En 2016 en Arabia Saudita, se aislaron y caracterizaron bacterias degradadoras de HAPs de sedimentos contaminados. Estas bacterias fueron

enriquecidas en Bushnell-Haas (BH) con 1% de 1000 mg/L de HAPs a 37 °C a 100 rpm durante 7 días, también se estudiaron las morfologías de células y colonias de los aislamientos con microscopios de luz y de barrido electrónico (SEM), las propiedades fisicoquímicas de la pared celular fueron evaluados con la prueba de Gram. Los aislados se identificaron con la secuenciación de ARNr 16S. Se caracterizaron morfológicamente cuatro aislamientos como cepas de bacilos Gram negativos y los resultados de secuencia del ARNr 16S reveló que los aislamientos estaban estrechamente relacionados con *Pseudomonas aeruginosa*, *P. citronellolis*, *Ochrobactrum intermedium* y *Cupriavidus taiwanensis*. En conclusión, las cepas bacterianas aisladas podrían desarrollarse aún más para su uso eficiente en la biodegradación de HAPs ⁽²⁵⁾.

En 2014 en Ecuador, investigaron el crecimiento poblacional de los consorcios bacterianos de un suelo prístino de Bosque Húmedo Tropical y de un suelo contaminado en presencia de Fenantreno. El desarrollo de los consorcios se realizó caldo Bushnell Hass en frascos Erlenmeyer en agitación a 150 rpm y 25°C y midieron el crecimiento por espectrometría a 600 nm. Además, aislaron el ADN bacteriano para la posterior amplificación del gen 16s ARNr mediante PCR. En la fase exponencial del crecimiento bacteriano observaron duplicación celular, además, la presencia de bandas en el DGGE que confirmaron presencia de comunidades bacterianas. En conclusión, existe mayor población inicial bacteriana en el suelo prístino, corroborado en las bandas de electroforesis que indican presencia de bacterias ⁽²⁶⁾.

En 2013 en China, investigaron la degradación de HAPs por consorcios microbianos de tres tipos de suelos utilizando dos medios de cultivos, se aislaron los consorcios microbianos utilizando dos medios diferentes de cultivo (MYE y LB). Realizaron PCR con cebadores universales de bacterias (PRBA 338 y PRUN518R) para posteriormente hacer el análisis en el gel de electroforesis de gradiente desnaturizante, además, la degradación fue analizado por cromatografía de gases. Se obtuvieron seis consorcios microbianos de tres suelos diferentes contaminado con petróleo, de los cuales tres consorcios bacterianos enriquecidos con medio MYE mostraron tasas de

degradación de PAH más altas que los consorcios enriquecidos con medio LB. Las bacterias degradadoras incluyeron cepas de *Stenotrophomonas*, *Bacterium*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *gamma proteobacterium*, *Citrobacter* y *Raoultella*. Entre estos, *Bacterium*, *Citrobacter* y *Bacillus* son degradadores bien conocidos de PAH en el suelo ⁽²⁷⁾.

En 2000 en Bélgica, se investigó las bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos de muestras de suelos y lodo contaminados con HAPs, donde se compararon dos procedimientos diferentes para aislar bacterias que utilizan hidrocarburos aromáticos policíclicos, es decir, cultivos de enriquecimiento agitados en un medio mineral líquido en el que se suministraron HAPs en forma de cristales. El enriquecimiento líquido seleccionó principalmente *Sphingomonas* spp., mientras que el método de membrana condujo exclusivamente a la selección de *Mycobacterium* spp. Además, en configuraciones separadas de enriquecimiento de membranas con diferentes tipos de membranas, se recuperaron tres cepas de *Mycobacterium* relacionadas con PCR palindrómicas extragénicas repetitivas. En conclusión, se demostró que los materiales en los que se absorben los HAPs son útiles para seleccionar y aislar nuevas bacterias adheridas, hidrofóbicas y degradadoras de contaminantes, que pueden escapar a las técnicas clásicas de aislamiento microbiológico ⁽²⁸⁾.

1.2 Bases teóricas

1.2.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los HAPs son contaminantes orgánicos compuestos por dos o más anillos aromáticos de carbono y átomos de hidrógeno, que son principalmente incoloros, blancos o compuestos sólidos de color amarillo pálido. Los arreglos moleculares de los anillos aromáticos en el espacio pueden ser lineales, angulares o agrupados. Con el número de anillos presentes en los compuestos, se clasifican en HAPs de peso molecular ligero (tienen dos o tres anillos aromáticos) y HAPs de alto peso molecular (tienen cuatro o más anillos aromáticos). Dependiendo de su peso molecular, se emiten como fase gaseosa (HAPs de BPM) o en forma de partículas (HAPs de HMW) ^(8,29).

Según la estructura de los anillos, los HAPs también se clasifican como: HAPs alternativos, que contienen solo la fusión de seis anillos de carbono benceno, mientras que los HAPs no alternantes como el fluoreno contienen la fusión de seis anillos de carbono benceno junto con un anillo adicional de menos de seis carbonos. Los HAPs tienen baja solubilidad en agua, baja presión de vapor y altos puntos de fusión y ebullición, según sus estructuras. Los HAPs con mayor peso molecular tienden a disminuir la solubilidad en agua y aumentar la lipofilia, lo que los convierte en compuestos más recalcitrantes ⁽⁸⁾.

1.2.2 Producción de hidrocarburos aromáticos policíclicos

Las fuentes de contaminación por HAPs se clasifican principalmente en dos, como las fuentes de emisión antropogénica y las fuentes de emisión natural ⁽⁸⁾. La principal fuente de HAPs proviene de la combustión de material orgánico. Los HAPs se forman naturalmente durante producción geológica térmica y durante la quema de vegetación en incendios forestales y de matorrales. Sin embargo, fuentes antropogénicas son los principales determinantes de la contaminación por HAPs, estos son las fuentes de emisión industriales, móviles, domésticas y agrícolas. Particularmente la combustión de combustible, procesos pirolíticos, derrame de productos derivados del petróleo, incineración de residuos domésticos, son fuentes importantes de HAPs en el medio ambiente. En los países industriales, las actividades de combustión antropogénicas son fuentes principales de HAPs en los suelos, donde surgen de la deposición atmosférica. Esto había llevado a un aumento en la concentración de HAPs en el suelo durante los últimos 100 ± 150 años ⁽¹⁷⁾. La alta contaminación de HAPs en un área rural se debe principalmente a fuentes domésticas y agrícolas, mientras que en un área urbana se debe a fuentes industriales, móviles y domésticas ⁽⁸⁾.

1.2.3 Toxicidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos

Muchos HAPs son cancerígenos y, por lo tanto, son motivo de gran preocupación como contaminantes ambientales. Numerosos estudios han indicado que los compuestos de uno, dos y tres anillos son sumamente tóxicos, mientras que los HAPs de mayor peso molecular se consideran

genotóxicos. Por ejemplo, benzo[a]pireno es uno de los HAPs cancerígenos más potentes y, como tal, es el compuesto más estudiado de la clase HAPs. Benzo[a]pireno ha demostrado ser cancerígeno al producir tumores en animales de experimentación cuando ingieren, aplicación cutánea, inhalación y/o administración intratraqueal, administración subcutánea y/o intramuscular, administración intraperitoneal, implantación intrabronquial y vía transplacentaria. También se ha demostrado que benzo[a]pireno es activo en ensayos de reparación de ADN bacteriano, inducción de bacteriófagos y mutaciones de *Drosophila melanogaster*. En células de mamíferos cultivadas, benzo[a]pireno puede inducir la unión del ADN, el intercambio de cromátidas hermanas, las aberraciones cromosómicas, mutaciones y transformaciones (17).

Actualmente, no existen estudios epidemiológicos sobre la carcinogenicidad del benzo[a]pireno en humanos; sin embargo, los datos de bioensayos en animales se han extrapolado para estimar el riesgo de cáncer en humanos. Estas estimaciones se basaron en una serie de suposiciones: 1. se suponía que el cáncer era irreversible e implicaba una serie de etapas biológicas; 2. la tasa de ocurrencia de cada etapa varió linealmente con dosis; 3. la incidencia de cáncer aumentó con la edad; la incidencia de fondo y químicamente inducida se asumió que el cáncer era aditivo; 5. el tiempo de exposición de por vida de los animales; 6. el área de superficie es aproximadamente proporcional al peso corporal; y 7. el benzo[a]pireno absorbido por el tracto respiratorio después de la inhalación es el mismo para ratones y humanos (17).

1.2.4 Remediación microbiana de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los métodos biológicos son respetuosos con el medio ambiente y recientemente han ganado mucha atención para la remediación de HAPs debido a varios inconvenientes de los métodos físicos y químicos, incluido el costo, la complejidad del procedimiento, la carga reglamentaria y la falta de degradación completa. Las técnicas de biorremediación se clasifican en términos generales como ex situ o in situ. Las técnicas ex situ implican la remoción física de los materiales contaminados (suelo: excavación y agua: bombeo) a otra área posiblemente dentro del sitio para su tratamiento. Las

técnicas in situ involucran el tratamiento del material contaminado en el lugar, las cuales cuentan con un gran consentimiento público debido a un menor gasto, mínima interrupción del sitio y alta posibilidad de eliminación permanente de residuos ⁽⁸⁾.

Los métodos biológicos han ganado una amplia atención para la remediación de los HAPs, seguidos de los métodos integrados, la oxidación química y los métodos físicos. La remediación microbiana de HAPs (bioaugmentación y bioestimulación) se ocupa de la aplicación separada o combinada de microbios específicos como bacterias, arqueas, hongos y algas. Sin embargo, la degradación asistida por bacterias y hongos se ha estudiado ampliamente ⁽³⁰⁾.

1.2.5 Remediación bacteriana de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Las bacterias son la clase de microorganismos que participan activamente en la degradación de contaminantes orgánicos de sitios contaminados. Se conoce que varias especies bacterianas degradan los HAPs, la mayoría de ellos, que representan la eficiencia de biodegradación, están aislados de la contaminación suelo o sedimentos. Entre los HAPs de los residuos petroquímicos, el benzo (a) pireno es considerado como el más cancerígeno y tóxico. Los estudios tienen demostrado que las bacterias pueden degradar el benzo (a) pireno cuando se cultivan en una fuente alternativa de carbono nativo en experimentos de cultivo líquido ⁽²⁾.

Las bacterias tienen una versatilidad metabólica única para la degradación de contaminantes HAPs. Durante la degradación aeróbica bacteriana de HAPs, el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, así como cosustrato para la hidroxilación y la escisión mediada por oxígeno del anillo aromático, mientras que la degradación anaeróbica bacteriana de HAPs utiliza un enfoque diverso para romper y abrir el anillo aromático según el tipo de reacción reductora y los aceptores finales de electrones alternativos. Principalmente, las bacterias realizan la degradación aeróbica de HAPs utilizando un metabolismo facilitado por la oxigenasa (que comprende las

enzimas monooxigenasa y dioxigenasa). El primer paso en la degradación aeróbica de HAPs es la hidroxilación del anillo aromático a través de enzimas dioxigenasa y la formación del cis-dihidrodiol, que finalmente se oxida a diol intermedios con la ayuda de enzimas deshidrogenasa ⁽⁸⁾.

Estos intermedios de diol finalmente se abren mediante la acción de dioxigenasas que rompen el anillo intradiol o extra diol a través de la ruta de ortoescisión o metaescisión, capaces de formar intermediarios como catecol, ácidos gentísicos y ácido protocatecuico, que finalmente se transforman en tricarbóxico, intermedios del ciclo del ácido (TCA). La dioxigenasa es el complejo multienzimático que generalmente comprende subunidades de reductasa, ferredoxina y oxigenasa terminal. Las bacterias también elaboran estrategias para la degradación de HAPs por la vía asistida por el citocromo P450 con la formación de trans-dihidrodiolos o anaeróticamente en condiciones de reducción de nitratos y sulfatos ⁽⁸⁾.

La degradación por bacterias inmovilizadas y bacterias modificadas genéticamente también es un enfoque considerable. Una de las mayores dificultades para la degradación en suelo / sedimento es la dispersión del inóculo; es fácil para el suelo superficial, sin embargo, desafiante para el suelo subterráneo debido al transporte microbiano limitado ya que las células se adhieren fuertemente a la materia orgánica del suelo. También se reportaron extremófilos bacterianos como halófilos, acidófilos y termófilos para la degradación de HAPs. La aplicación de bacterias termotolerantes y termófilas para la degradación de los HAPs es beneficiosa, ya que la temperatura elevada provoca una mayor difusión de los HAPs al disminuir la viscosidad y, en última instancia, aumenta la biodisponibilidad de los HAPs. Durante la última década, análisis de comunidades bacterianas, vías bioquímicas en bacterias para la degradación de HAPs, degradación asociada genes bacterianos, sistemas enzimáticos y regulación génica de los procesos de degradación de HAPs se han investigado enormemente ⁽⁸⁾.

1.3 Definición de términos básicos

Petróleo: líquido oleoso bituminoso (color oscuro) de origen natural que es una mezcla compleja de compuestos alifáticos e hidrocarburos aromáticos.

Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs): componentes de hidrocarburos que contiene dos o más anillos de benceno fusionados en forma lineal, arreglos angulares o agrupados, además, son compuestos hidrófobos y su persistencia en el ambiente se debe principalmente a su baja solubilidad en agua. La solubilidad disminuye y la hidrofobicidad aumenta con un aumento en el número de anillos de benceno fusionados ⁽¹⁷⁾.

Conorcios microbianos: asociación natural de dos o más poblaciones microbianas diferentes, actuando en un sistema complejo como una comunidad, donde todos se benefician. Dicha asociación refleja estilos de vida sinérgicos o sintróficos, donde el crecimiento y flujo cíclico de nutrientes se transporta es más efectivo que en poblaciones individuales ⁽³¹⁾.

Conorcios bacterianos: asociación de diferentes especies bacterianas que poseen ventajas para lograr una eficaz biorremediación, creando una red con niveles de interacción que muestran una mejor adaptación, supervivencia y permanencia, permitiéndoles soportar entornos fluctuantes, otorgándoles solidez ante los cambios ambientales ⁽³²⁾.

Biorremediación: tratamiento para la recuperación de suelos contaminados con HAPs, por ser una técnica que se considera segura, amigable con el ambiente y económica. Proceso factible para remover los hidrocarburos del ambiente, el cual dependerá del tipo de hidrocarburo para lograr el éxito en días o meses ^(32,33). Este proceso ocurre naturalmente a través de la reducción de la concentración del contaminante (bioatenuación), sin embargo, este es un proceso lento que requiere una mejora con un suministro de nutriente (bioestimulación). Cuando el entorno a ser tratado no tiene los microorganismos apropiados, un inóculo de bacteria con las capacidades catalíticas deseadas (bioaumentación) puede ser agregado ⁽²²⁾.

Bioestimulación: basado en el suministro de nutrientes o sustratos adicionales a estimular la degradación de microorganismos nativos, puede también se puede utilizar para activar la biodegradación ⁽¹⁶⁾.

CAPITULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1. Formulación de la hipótesis

Los consorcios microbianos obtenidos de suelos de un bosque primario en la región Loreto presentan diferentes capacidades de biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Estas capacidades de biodegradación de HAPs, pueden ser evaluadas y comparadas para identificar el consorcio con mayor eficiencia en la degradación de estos contaminantes.

2.2. Variables y definiciones operacionales

Variables	Definición	Tipo por su relación	Indicador	Escala de medición	Categorías	Valores de la categoría	Medio de verificación
Consortios microbianos obtenidos	Son las bacterias y hongos que tienen la capacidad de biodegradar HAPs, debido a que pueden utilizar estos compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Esto se evidencia por su crecimiento y la observación microscópica de las células mediante tinción Gram y con bromuro de etidio.	Independiente	Crecimiento microbiano	Razón	Bajo	≤0.005	-Registros de los datos en el software del NanoDrop 2000 -Cuaderno de laboratorio
					Intermedio	0.005-0.010	
					Alto	>0.010	
			Tinción Gram	Nominal	Tipo	Positivo, negativo	Fotografías tomadas en el microscopio
					Forma	Coco, bacilo	
			Tinción Bromuro de etidio	Razón	Presencia	Fluorescencia roja	Fotografías tomadas en el microscopio
Ausencia	sin fluorescencia						
Amplicones de los genes ribosomales 16 S (bacterias) y la región ITS 2 (levaduras)	Nominal	Presencia de amplicones	Si No	Registro fotográfico de geles de agarosa con o sin amplicones de los genes ribosomales 16S y/o la región ITS2			
Capacidad de biodegradación de HAPs	Es la capacidad que tienen los consorcios de convertir, en una primera etapa de biodegradación, los HAPs en compuestos polifenólicos.	Dependiente	Contenido de polifenoles	Razón	Bajo	0 a <2,5 mg/L	Registros de los datos en el software del NanoDrop 2000
					Intermedio	≥2,5 a <5,0 mg/L	
					Alto	>5 mg/L	

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Diseño metodológico

El estudio tuvo un diseño experimental, longitudinal, analítico y prospectivo. Esto debido a que se manipularon las variables para evaluar la relación causa-efecto, y los datos fueron recolectados y analizados de manera progresiva a lo largo del tiempo.

3.2. Diseño muestral

3.2.1. Población de estudio

Estuvo conformada por los consorcios microbianos presentes en suelos de un bosque primario del área de concesión para la conservación de la cuenca alta, río Itaya (CCCARI) de la Universidad Científica del Perú (UCP).

3.2.2. Tamaño de la población de estudio

Estuvo constituida por los consorcios microbianos de 5 puntos de muestreo seleccionados, los cuales se obtuvieron de las muestras compuestas de los suelos de un bosque primario del CCCARI de la UCP.

3.2.3. Muestreo o selección de la muestra

Se realizó un muestreo no probabilístico (por conveniencia), dado que las muestras no fueron seleccionadas de manera aleatoria.

3.2.4. Criterios de selección

Se seleccionaron 5 puntos de muestreo considerando las características del suelo (limoso, franco limoso, franco arenoso, etc.), la topografía y la distancia al punto de acopio de las muestras (maloca de la UCP).

Criterios de inclusión

- Muestras representativas de suelos de un bosque primario obtenidos del CCCARI.

- Consorcios microbianos capaces de crecer en medio BH enriquecidos con HAPs.

Criterios de exclusión

- Muestras no representativas de suelos de un bosque primario obtenidos del CCCARI.
- Consorcios microbianos que no fueron capaces de crecer en medio BH enriquecidos con HAPs.

3.3. Procedimientos de recolección de datos

3.3.1. Técnicas de colecta de muestra

Se siguió el protocolo modificado desarrollado por Tajudeen, et al. 2016 ⁽³⁴⁾, recolectando 13 submuestras de 50 g por cada estrato (colina baja, colina intermedia y cima de colina) de los 5 puntos de muestreo seleccionados, luego, con una pala de mano se tomaron las muestras a una profundidad de ~10 - 15 cm, estas fueron puestos en bolsas plásticas estériles rotuladas y transportadas al laboratorio. Las 13 submuestras fueron homogenizadas, secadas (25°C por 24h) y tamizadas (~2 mm de diámetro). Las muestras se obtuvieron por triplicado en tubos falcón estériles y almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

3.3.2. Obtención y cultivo de consorcios microbianos

Las muestras de suelo (0.5 g) de cada estrato (colina baja, colina intermedia y cima de colina) fueron cultivadas por separado en tres frascos Erlenmeyer con 50 mL de medio Bushnell Haas (BH) (0,2 g/L de MgSO₄, 0,02 g/L de CaCl₂, 1 g/L de KH₂PO₄, 1 g/L K₂HPO₄, 1 g/L NH₄NO₃ y 0,05 g/L FeCl₃) y petróleo crudo al 1% para su aclimatación. Los cultivos se realizaron en una incubadora con agitación por 10 días a 25 °C y agitación constante a 180 rpm. Posteriormente, de cada cultivo inicial se transfirió 5 mL a matraces Erlenmeyer que contenía 45 mL de medio (BH) y 250 µL de HAPs (Antraceno, Fluoranteno y Pireno) a una concentración final de 50 mg/L. Estos fueron cultivados por 30 días adicionales bajo las mismas condiciones de cultivo,

pero haciendo subcultivos cada 10 días ^(21,22,28).

3.3.3. Crecimiento de los cultivos

Para evaluar el crecimiento de los consorcios microbianos se midió la absorbancia a 600 nm de alícuotas (2 µL) del cultivo con un espectrofotómetro Nanodrop® 2000 (ThermoFisher Scientific). Las lecturas se realizaron al inicio de cada 10 días y cada 48 horas ⁽²¹⁾.

3.3.4. Verificación de bacterias y levaduras

Se realizó la tinción Gram, que nos permitió clasificar las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram positivas y Gram negativas, y se realizó la tinción con Bromuro de Etidio que permitió verificar la presencia o ausencia de bacterias por la emisión de fluorescencia. Además, se realizó la tinción con azul de algodón de lactofenol para detectar levaduras e los consorcios. Las tinciones se realizaron cada 10 días ⁽³⁵⁾.

3.3.5. Purificación y amplificación del ADN metagenómico

Se realizó a partir de 10 mL de cultivos enriquecidos (BH + HAPs + Consorcios microbianos), la biomasa se cosechó por centrifugación a 10,000 g por 5 min, al precipitado microbiano se lavó dos veces con 1 mL de tampón fosfato 100 mM ajustado a pH 7,4, incluyendo etapas de resuspensión y centrifugación a 10,000 g por 10 min. Luego el ADNm fue purificado empleando el kit de purificación DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones y la pureza del ADNm se analizaron usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). La integridad del ADNm se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, a 100 V por 30 min. Finalmente, se corroboró la calidad del ADNm purificado mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) de una región del gen ribosomal 16S, para detectar bacterias y mediante amplificación de la región ITS2 para detectar levaduras. La reacción se realizó empleando el Platinum PCR Super Mix (Invitrogen), cebadores degenerados 515F (5'-TGTGNCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 926R (5'-CCGTCAATTCMTTRAGT-3'), cebadores ITS2F (5'-GAGCATGTCTGCCTCAGC-3') y ITS2R (5'-

GGTAGCCTTGCCTGAGC-3'), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95,0°C x 5 min, 35 ciclos a 95,0°C x 40 s, 55,0°C x 40 s y 72,0°C x 1 min y una extensión final a 72,0°C x 7 min, programadas en un Termociclador (Eppendorf Mastercycler Nexus gradient).

3.3.6. Biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

La biodegradación de los HAPs se determinó mediante cuantificación de polifenoles totales (TP), con el procedimiento de Folin-Ciocalteu ^(36–39). La reacción se realizó en una microplaca de 96 pocillos, donde se agregó 20 µL de cultivo celular, 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido (1:10), 40 µL de carbonato de sodio al 20% y 40 µL de agua destilada para completar el volumen total a 200 µL. La solución se agitó e incubó por 80 min a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) en oscuridad. La absorbancia se midió a 765 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Nanodrop® 2000 (ThermoFisher Scientific). La curva de calibración se realizó con soluciones de ácido gálico a concentraciones de 1, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por litro (mGAE/L). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.3.7. Procesamiento y análisis de datos

Los datos fueron almacenados en el software Microsoft Excel 2016. Se determinó si los datos tienen una distribución normal mediante el test de Kolmogórov-Smirnov. Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas en las capacidades de biodegradación de HAPs de los consorcios microbianos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y se aplicó la prueba post-hoc de Tukey, considerando un nivel de significancia de $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el Software R Studio versión 4.4.1 ⁽⁴⁰⁾.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Obtención y evaluación del perfil de crecimiento de tres consorcios microbianos

El perfil de crecimiento de los consorcios microbianos fue similar, aunque mostraron diferencias a lo largo del tiempo de cultivo. En la Figura 1 se observa que los consorcios cultivados en presencia de petróleo crudo al 1% y HAPs presentaron un mayor crecimiento en comparación con el control, que no contenía estos compuestos.

Entre los tres consorcios evaluados, el consorcio microbiano 1 (suelo de valle) mostró el mejor perfil de crecimiento, alcanzando los valores más altos de densidad óptica durante el tratamiento con HAPs. Los consorcios 2 y 3 también exhibieron un crecimiento significativo, aunque en menor medida que el consorcio 1.

Cabe destacar que los picos máximos de crecimiento se observaron en diferentes momentos a lo largo del tratamiento: al cuarto día de los primeros 10 días, al sexto día de los siguientes 10 días, y al sexto día de los últimos 10 días. Esto sugiere una adaptación y respuesta dinámica de los consorcios a la presencia de los HAPs en el medio.

En contraste, los cultivos de control, sin la adición de petróleo crudo ni HAPs, presentaron bajas densidades ópticas a lo largo del tiempo, lo que indica una menor actividad metabólica en ausencia de estos compuestos.

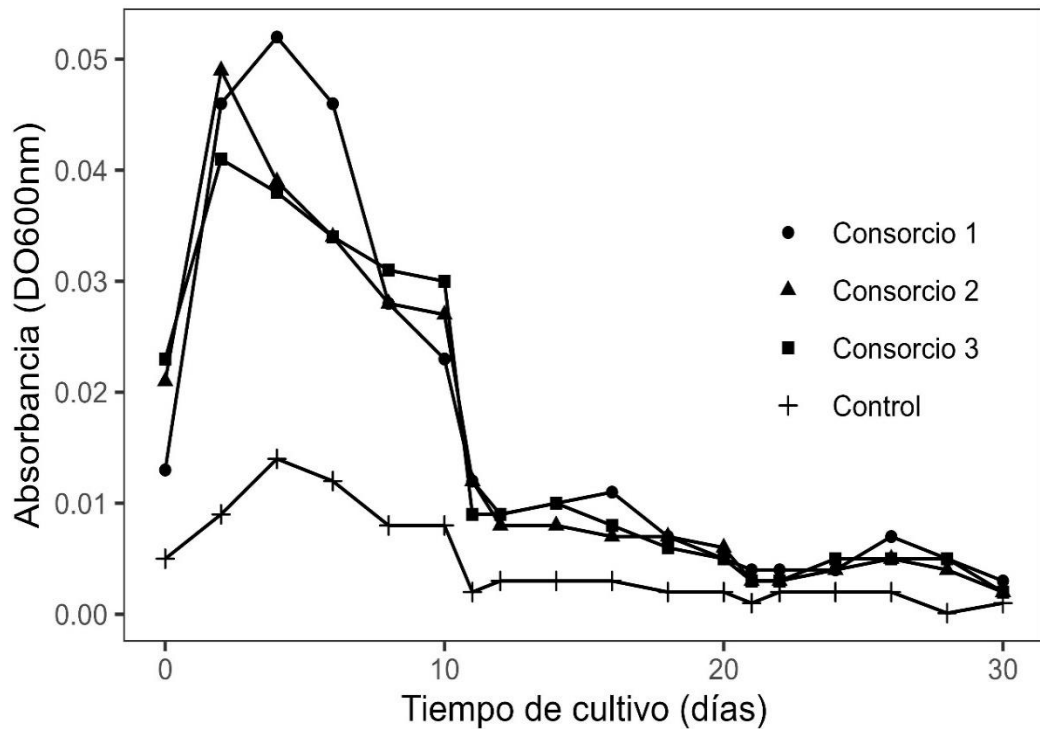


Figura 1: Perfil de crecimiento de los consorcios microbianos cultivados en medio Bushnell Haas enriquecidos con HAPs (50mg/L) durante 30 días.

4.2. Verificación de presencia microbiana en los consorcios

4.2.1. Tinción Gram, bromuro de etidio y azul de lactofenol

El análisis microscópico de los cultivos de los consorcios microbianos teñidos con el método de tinción Gram reveló la presencia de una diversidad de microorganismos, incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se observaron cocos Gram positivos y Gram negativos, bacilos Gram positivos y Gram negativos, y cocobacilos (Figura 2). La tinción con bromuro de etidio permitió la visualización de bacterias mediante la fluorescencia emitida por estas al interactuar con el colorante. Por otro lado, la tinción con azul de lactofenol permitió la observación de levaduras en los cultivos, aunque en cantidades bajas.

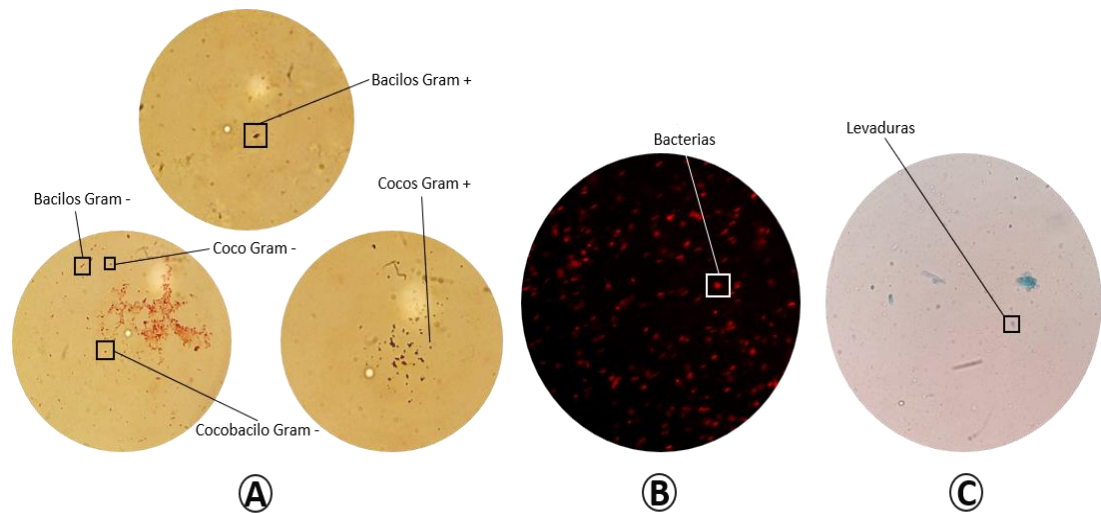


Figura 2: Verificación de presencia de microorganismos en los consorcios microbianos enriquecidos con HAPs. **A.** Tinción Gram, **B.** Tinción con bromuro de etidio, **C.** Tinción azul de Lactofenol.

4.2.2. Análisis de Purificación y amplificación de ADNm

La purificación del ADNm de los consorcios microbianos degradadores de HAPs de muestras de suelos fue aprobada. Mediante el análisis espectrofotométrico, se evidenció la buena calidad del ADNm purificado con ratios de absorbancias $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ de $1,91 \pm 0,02$, y $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ de $1,91 \pm 0,05$ respectivamente, esto demuestra que no hubo contaminación por proteínas, polisacáridos y/o polifenoles, así mismo, se obtuvieron concentraciones de $251,65 \pm 18,86$ ng/ μL que son aceptables para la amplificación de ADNm. Además, mediante el análisis electroforético se visualizó el ADNm íntegro y bien definido, sin contaminación y degradación. Los productos de la amplificación del ADNm mediante reacción en cadena de polimerasa (RCP) convencional utilizando cebadores específicos para bacterias y levaduras, muestra a través del análisis electroforético la presencia de bandas definidas de amplicones para bacterias, y la ausencia de bandas para levaduras (Figura 3).

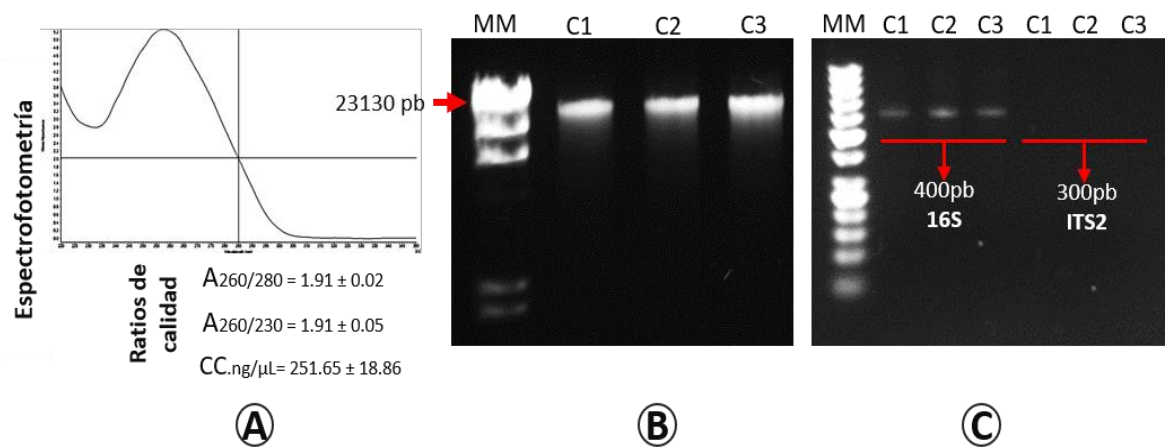


Figura 3 : Análisis espectrofotométrico y electroforético de ADN metagenómico, y producto de amplificación del ADN metagenómico por PCR. **A)** Espectrofotometría de ADNm **B).** Electroforesis de ADNm y **C).** Electroforesis del producto de PCR del ADNm.

4.3. Capacidad biodegradadora de HAPs de los tres consorcios microbianos obtenidos.

El contenido de polifenoles totales (PT) generado por los consorcios microbianos de suelos como producto de la degradación de HAPs, se revelaron a través del método Folin-Ciocalteu expresado en miligramo equivalentes de ácido gálico por litro (mgGAE/L). El análisis de varianza (ANOVA) arrojó un valor de significancia de $p= 0,70$, que demuestra que no existió diferencias estadísticas significativas en las capacidades de degradación de HAPs de los consorcios microbianos. Las concentraciones más altas de polifenoles totales de los consorcios microbianos enriquecidos con HAPs fueron del consorcio 1, estos fueron en promedio 19,49, 7,87 y 4,20 mgGAE/L a los 10, 20, y 30 días del cultivo respectivamente, a diferencia del consorcio 2 y 3 que tuvieron en promedio concentraciones más bajas como se evidencia en la Tabla 1.

Tabla 1: Concentración de polifenoles totales de los consorcios microbianos enriquecidos con HAPs como única fuente de carbono y energía.

Tiempo de cultivo (días)	Consortios microbianos	Concentración de polifenoles totales (mgGAE/L)
		Promedio \pm DS
1-10	1	19,49 + 1,26
	2	17,17 + 1,10
	3	18,33 + 1,10
10-20	1	7,87 + 0,81
	2	6,13 + 0,69
	3	6,33 + 0,81
20-30	1	4,20 + 1,25
	2	3,42 + 1,26
	3	3,62 + 1,10

CAPITULO V: DISCUSIÓN

5.1. Obtención y evaluación del perfil de crecimiento de tres consorcios microbianos

Para la obtención de consorcios microbianos biodegradadores de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), se requiere el uso de medios de cultivos enriquecidos. Entre estos, el medio Bushnell-Hass ha sido ampliamente utilizado para estudiar el deterioro microbiológico de hidrocarburos, ya que contienen todos los nutrientes necesarios para la biodegradación. Por esta razón, en la presente investigación se utilizó el medio mineral Bushnell-Hass con petróleo (para la aclimatación) y HAPs (para el tratamiento) como única fuente de carbono y energía para la obtención de consorcios microbianos biodegradadores de hidrocarburos.

En nuestro estudio, las densidades ópticas (DO) de los consorcios microbianos que degradan HAPs fueron mayores de 0,100 durante la fase de aclimatamiento y menores de 0,100 durante el tratamiento. Estos datos son similares a los conseguidos por Guerra et al. ⁽²²⁾, quienes enriquecieron muestras de residuos de perforación en medios de cultivo (incluyendo Bushnell Hass) en presencia de petróleo, obteniendo valores de DO entre 0,100 y 0,800, y observaron un mayor crecimiento en los cultivos enriquecidos con petróleo.

Asimismo, Maldonado ⁽²⁶⁾ trabajó con muestras de suelo prístino y contaminadas para obtener consorcios capaces de degradar el HAP fenantreno en medio Bushnell Hass, registrando valores de absorbancia entre 0,012 y 0,885, con el máximo crecimiento los días 7 y 8. En su estudio, la población inicial de bacterias fue mayor en el suelo prístino debido a su alto contenido de materia orgánica en descomposición.

Además, Kumar et al. ⁽⁴¹⁾ aislaron un cultivo bacteriano puro de muestras de suelo contaminado enriquecido, basándose en su capacidad para crecer en petróleo crudo y utilizar vapor de naftaleno como única fuente de carbono, obteniendo densidades ópticas de 0,200 a 1,400 en 108 horas. Por otro lado, Oyehan et al. ⁽²⁵⁾ obtuvieron densidades ópticas menores a 0,020 al trabajar

con muestras de sedimentos de zonas costeras contaminadas con petróleo, para aislar bacterias que degradan pireno y fenantreno (HAPs) en medio Bushnell Hass.

También, Jacques et al. ⁽⁴²⁾ obtuvieron un consorcio con 26 aislamientos capaces de degradar antraceno como única fuente de carbono. Geetha et al. ⁽⁴³⁾ aislaron 14 bacterias diferentes de muestras de suelo contaminado con petróleo, con capacidad de crecer en diversos hidrocarburos. Finalmente, Wu et al. ⁽²⁷⁾ obtuvieron seis consorcios microbianos que degradan HAPs a partir de suelos contaminados utilizando dos medios de cultivo enriquecidos.

5.2. Verificación de la presencia de bacterias y hongos en los consorcios microbianos

En nuestro estudio, logramos verificar la presencia de bacterias y hongos en los consorcios microbianos biodegradadores de HAPs. Mediante la tinción Gram, se diferenciaron las células bacterianas Gram positivas y Gram negativas, predominando las bacterias Gram negativas en forma de coco y bacilos. Resultados similares fueron obtenidos por Cason et al. ⁽²¹⁾, al observar principalmente bacilos Gram negativos; Oyehan et al. ⁽²⁵⁾, donde todos sus aislados eran Gram negativos y tenían forma de bastón, mencionando que la prevalencia de bacterias en forma de bastón en cultivos de biodegradación es muy común; Liu et al. ⁽⁴⁴⁾, quienes observaron que la mayoría de las 24 cepas aisladas eran bacterias Gram negativas, y Jacques et al. ⁽⁴²⁾, quienes obtuvieron un consorcio con 26 aislamientos, de los cuales dieciocho eran bacilos Gram negativos, cinco bacilos Gram positivos, dos cocos bacilos Gram negativos y un coco Gram positivo. Así mismo, mediante tinción con bromuro de etidio se observó la presencia de bacterias en los cultivos, y mediante tinción azul de lactofenol, la presencia de levaduras.

Para la verificación de la presencia de microorganismos en los consorcios a nivel molecular, el primer paso es la extracción y purificación de ADN metagenómico (ADNm) de los consorcios. Este paso es fundamental para poder continuar con estudios posteriores. En nuestro estudio, el protocolo utilizado para la purificación nos permitió obtener ADNm de alta calidad y

cantidad para la amplificación del ADNm mediante PCR, obteniendo ratios de absorbancias A260nm/A280nm de $1,91 \pm 0,02$, y A260nm/A230nm de $1,91 \pm 0,05$, y concentraciones de $251,65 \pm 18,86$ ng/ μ L. Resultados similares fueron reportados por Akbari et al. ⁽⁴⁵⁾, al obtener ADN metagenómico de suelos contaminados con ratios de calidad A260nm/A280nm de 1,82 y A260nm/A230nm de 2,12, con concentraciones de 167,9 ng/ μ L. Sin embargo, nuestros resultados difieren ligeramente de los reportados por Dasgupta et al. ⁽⁴⁶⁾, quienes realizaron la extracción y purificación de ADN de suelos contaminados con petróleo crudo, obteniendo ratios de calidad A260nm/280nm de 1,74 con el método convencional y 1,80 con un kit de aislamiento, con concentraciones de 16,67 ng/ μ l con el método convencional y 8,05 ng/ μ l con el kit de aislamiento, siendo estas concentraciones muy bajas en comparación con las obtenidas en nuestro estudio, que son superiores a 100 ng/ μ L.

En nuestro estudio, el análisis electroforético se realizó en gel de agarosa al 0.8%, observándose bandas de ADNm integras y bien definidas, resultados similares a los obtenidos por Maldonado ⁽²⁶⁾, Akbari et al. ⁽⁴⁵⁾ y Dasgupta et al. ⁽⁴⁶⁾. Asimismo, los productos de la amplificación del ADNm en nuestro estudio fueron de ~400 pb, resultado similar al obtenido por Maldonado ⁽²⁶⁾ con bandas de ~300 pb. Sin embargo, hubo diferencias con los resultados de Akbari et al. ⁽⁴⁵⁾ y Dasgupta et al. ⁽⁴⁶⁾, quienes obtuvieron bandas de ~1500 pb, y Oyehan et al ⁽²⁵⁾, que obtuvo fragmentos de ADN que amplificaron a ~1400 pb.

5.3. Capacidad biodegradadora de HAPs de los consorcios microbianos

La capacidad biodegradadora de los consorcios microbianos se determinó a través del contenido de polifenoles totales (PT). Las concentraciones más altas de polifenoles totales en los consorcios microbianos enriquecidos con HAPs se observaron en el consorcio 1, con un promedio 19,49, 7,87 y 4,20 mgGAE/L a los 10, 20, y 30 días de cultivo, respectivamente, en comparación con los consorcios 2 y 3. Los resultados mostraron que la mayor degradación de HAPs ocurre en los primeros diez días de evaluación, similares a los

obtenidos por Wu et al. ⁽²⁷⁾, quienes observaron que los HAPs antraceno, fenantreno y pireno fueron degradados rápidamente por los consorcios microbianos durante 10 días de incubación. Las tasas de degradación de los HAPs totales fueron del 62%, 75% y 85% al inocular los consorcios C-1, G-1 y J-1, y del 51%, 31% y 53% al inocular C-2, G-2 y J-2, respectivamente.

Asimismo, Oyehan et al ⁽²⁵⁾ reportaron que, en 15 días de incubación, los aislados degradaron el fenantreno, reduciendo su concentración al 94% y 80%, mientras que en la degradación del pireno se logró una reducción del 60%. Además, Jacques et al ⁽²⁰⁾ registraron que su consorcio microbiano degradó el antraceno, el fenantreno y el pireno agregados al medio en un 48%, 67% y 22% respectivamente durante 30 días de incubación.

CAPITULO VI: CONCLUSIONES

Se logró obtener tres consorcios microbianos y la evaluación de su crecimiento, empleando HAPs como única fuente de energía y carbono en muestras de suelo de un bosque primario del Área de Concesión para la Conservación Cuenca Alta del Rio Itaya.

Se verificó la presencia de bacterias y hongos en los consorcios microbianos biodegradadores de HAPs mediante análisis microscópicos como tinción Gram, tinción Bromuro de Etidio y tinción Azul de Lactofenol, y análisis moleculares a través de la purificación del ADNm y posterior amplificación del ADNm por PCR.

Se determinó la capacidad biodegradadora de HAPs de los tres consorcios microbianos obtenidos de muestras de suelos mediante análisis de polifenoles totales producidos según el procedimiento de Folin-Ciocalteu.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

Realizar el cultivo de los consorcios microbianos con diferentes concentraciones de HAPs y con otros medios de cultivos, para identificar las mejores condiciones (concentración de HAPs y medio de cultivo) donde mejor crecen y se desarrollan dichos microorganismos, y así aislar las mejores cepas con mayor capacidad biodegradativa de HAPs.

Obtener consorcios microbianos de otros tipos de suelos contaminados o no contaminados con HAPs y otros derivados de petróleo en la Amazonía Peruana, realizar la evaluación de crecimiento de los consorcios microbianos, la verificación de bacterias y hongos mediante análisis microscópicos y moleculares, y la capacidad de biodegradación.

CAPÍTULO VIII : FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Gan S, Lau E, Ng H. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J Hazard Mater.* 2009;172(2-3):532-49. Disponible en: [10.1016/j.jhazmat.2009.07.118](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.118)
2. Haritash A, Kaushik C. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J Hazard Mater.* 2009;169(1-3):1-15. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389409005494>
3. Moscoso F, Deive F, Longo M, Sanromán M. Insights into polyaromatic hydrocarbon biodegradation by *Pseudomonas stutzeri* CECT 930: operation at bioreactor scale and metabolic pathways. *Int J Environ Sci Technol.* 2015;12(4):1243-52. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s13762-014-0498-y>
4. Recabarren T, Orazi M, Marcovecchio J, Arias A. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en ambientes marinos: Una revisión de América. *JAINA Costas Mares Ante El Cambio Climático.* 2020;1(2):19-40. Disponible en: <https://jainaccc2.uacam.mx/index.php/jainaccc/article/view/17>
5. Colombo M, Cavalca L, Bernasconi S, Andreoni V. Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon contaminated soils by native microflora and bioaugmentation with *Sphingobium chlorophenicum* strain C3R: A feasibility study in solid- and slurry-phase microcosms. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2011;65(1):191-7. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830510001939>
6. Johnsen A, Wick L, Harms H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut.* 2005;133(1):71-84. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749104001587>
7. Kronenberg M, Trably E, Bernet N, Patureau D. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Using microbial bioelectrochemical systems to overcome an impasse. *Environ Pollut.* 2017;231:509-23.

- Disponibile en:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749117321127>
8. Patel A, Shaikh S, Jain KR, Desai C, Madamwar D. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. *Front Microbiol.* 2020;11:562813. Disponible en:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.562813/full>
 9. Samanta S, Singh O, Jain R. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 2002;20(6):243-8. Disponible en:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779902019431>
 10. Wild S, Jones K. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: A preliminary source inventory and budget. *Environ Pollut.* 1995;88(1):91-108. Disponible en:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/026974919591052M>
 11. Bianchini F. Informe sobre los reportes de calidad ambiental en la zona de extracción petrolífera del río Pastaza. 2013;
 12. OEFA. Derrames en Loreto, Amazonas y Uruarinas Petroperú - Oleoducto Norperuano. 2016;1-18. Disponible en:
<https://www.congreso.gob.pe/Docs/comisiones2016/PueblosAndinosEcologia/files/addocumentos/informe.pdf>
 13. Lizardi MA, Leal RM, Ordaz A, Reyna R. Airlift bioreactors for hydrocarbon water pollution remediation in a tourism development pole. *Desalination Water Treat.* 2015;54(1):44-9. Disponible en:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19443994.2013.876670>
 14. Blanco E, Zavala F, Peralta M, Ballinas L, Salmerón I, Rubio H, et al. Characterization of a Microbial Consortium for the Bioremoval of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Water. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(5):975. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1660-4601/15/5/975>
 15. Sanchez A, Bajić D, Osborne M, Poyatos J, Sanchez A. High-order

- interactions distort the functional landscape of microbial consortia. Shou W, editor. *PLOS Biol.* 2019;17(12):e3000550. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.3000550>
16. Lang F, Destain J, Delvigne F, Druart P, Ongena M, Thonart P. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mangrove Sediments Under Different Strategies: Natural Attenuation, Biostimulation, and Bioaugmentation with *Rhodococcus erythropolis* T902.1. *Water Air Soil Pollut.* 2016;227(9):297. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s11270-016-2999-4>
 17. Juhasz A, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2000;45(1-2):57-88. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830500000524>
 18. Blanco E lupe, Zavala F, Peralta M, Ballinas L, Rocha B. Análisis de la biorremoción de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en agua por SPME-GC/MS. *Rev Int Contam Ambient.* 2019;35(esp03):27-36. Disponible en: <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/RICA.2019.35.esp03.04/46924>
 19. Lors C, Damidot D, Ponge JF, Périé F. Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAH-contaminated soil at field and laboratory scales. *Environ Pollut.* 2012;165:11-7. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749112000760>
 20. Jacques R, Okeke B, Bento F, Peralba M, Camargo F. Characterization of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon–Degrading Microbial Consortium from a Petrochemical Sludge Landfarming Site. *Bioremediation J.* 2007;11(1):1-11. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10889860601185822>
 21. Cason E, Vermeulen J, Müller W, Van Heerden E, Valverde A. Aerobic and anaerobic enrichment cultures highlight the pivotal role of facultative

- anaerobes in soil hydrocarbon degradation. *J Environ Sci Health Part A*. 2019;54(5):408-15. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10934529.2018.1558902>
22. Guerra A, Oliveira J, Silva R, Araújo W, Carlos A, Vasconcelos A, et al. Metagenome enrichment approach used for selection of oil-degrading bacteria consortia for drill cutting residue bioremediation. *Environ Pollut*. 2018;235:869-80. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749117330531>
23. Contreras H, Carreño C. Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado. *Rev Científica UNTRM Cienc Nat E Ing*. 2018;1(1):27-33. Disponible en: <https://revistas.untrm.edu.pe/index.php/CNI/article/view/269>
24. Milic J, Avdalovic J, Solevic T, Gojgic G, Jednak T, Vrvic M. Initial microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Ind Chem Eng Q*. 2016;22(3):293-9. Disponible en: <https://doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1451-93721500043M>
25. Oyehan T, Al-Thukair A. Isolation and characterization of PAH-degrading bacteria from the Eastern Province, Saudi Arabia. *Mar Pollut Bull*. 2017;115(1-2):39-46. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X16309031>
26. Maldonado J. Estudio de la capacidad de crecimiento y estructura poblacional de consorcios bacterianos en presencia de fenantreno, procedentes de un suelo prístino y uno contaminado de la región amazónica del Ecuador. Tesis de pregrado. Universidad Internacional SEK; 2014. Disponible en: <http://localhost:8080/xmlui/handle/123456789/815>
27. Wu M, Chen L, Tian Y, Ding Y, Dick WA. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. *Environ Pollut*. 2013;178:152-8. Disponible en:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749113001206>

28. Bastiaens L, Springael D, Wattiau P, Harms H, deWachter R, Verachtert H, et al. Isolation of Adherent Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Degrading Bacteria Using PAH-Sorbing Carriers. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(5):1834-43. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.66.5.1834-1843.2000>
29. Abdel-Shafy H, Mansour M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt J Pet.* 2016;25(1):107-23. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1110062114200237>
30. Kuppusamy S, Thavamani P, Venkateswarlu K, Lee YB, Naidu R, Megharaj M. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere.* 2017;168:944-68. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653516315065>
31. Ochoa DC, Montoya A. Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *Rev Fac Cienc Económicas.* 2010;18(2):55-74. Disponible en: <http://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfce/article/view/2272>
32. Macchi M. Desarrollo de consorcios bacterianos con alta eficiencia de degradación de PAH para su aplicación a la recuperación de suelos crónicamente contaminados. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata; 2018. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10915/66553>
33. Tirado D, Acevedo O, Romo C, Marmolejo Y, Gayosso M. Participación de consorcios microbianos en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. 2015;2(3).
34. Salam L, Obayori O. Structural and functional metagenomic analyses of a tropical agricultural soil. *Span J Soil Sci.* 2019;9:3672. Disponible en: [10.3232/SJSS.2019.V9.N1.01](https://doi.org/10.3232/SJSS.2019.V9.N1.01)

35. López L, Hernández M, Colín C, Ortega S, Cerón G, Franco R. Las técnicas básicas en el laboratorio de microbiología. 2014;
36. Cao W, Zhang J, Bia W, Cheng N. A modified Folin-Ciocalteu method for the micro determination of total phenolic content in honey. *Int Food Res J*. 2020;27(3):576-84. Disponible en: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20203331604>
37. Mwamatope B, Tembo D, Chikowe I, Kampira E, Nyirenda C. Total phenolic contents and antioxidant activity of *Senna singueana*, *Melia azedarach*, *Moringa oleifera* and *Lannea discolor* herbal plants. *Sci Afr*. 2020;9:e00481. Disponible en: 10.1016/j.sciaf.2020.e00481
38. Pico J, Pismag R, Laudouze M, Martinez M. Systematic evaluation of the Folin–Ciocalteu and Fast Blue BB reactions during the analysis of total phenolics in legumes, nuts and plant seeds. *Food Funct*. 2020;11(11):9868-80. Disponible en: 10.1039/D0FO01857K
39. Pacheco F, Peraza M, Orosco C, Ramirez D, Pinto I. Determinación de compuestos fenólicos totales y evaluación de la actividad antioxidante de té verde comercial y artesanal comercializados en Maracay, Venezuela. *Rev Boliv Quím*. 2020;37(1). Disponible en: http://www.bolivianchemistryjournal.org/QUIMICA%202020A%20PDF/4_Green_Tea-Pacheco2020.pdf
40. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2024. Disponible en: <https://www.R-project.org/>
41. Kumar M, Leon V, Materano A, Ilzins O, Galindo I, Fuenmayor SL. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by Biosurfactant-Producing *Pseudomonas* sp. IR1. *Z Für Naturforschung C*. 2006;61(3-4):203-12. Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/znc-2006-3-409/html>
42. Jacques R, Okeke B, Bento F, Peralba M., Camargo F. Improved Enrichment and Isolation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)-

- Degrading Microorganisms in Soil Using Anthracene as a Model PAH. *Curr Microbiol.* 2009;58(6):628-34. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-009-9381-3>
43. Geetha S, Joshi SJ, Kathrotiya S. Isolation and Characterization of Hydrocarbon Degrading Bacterial Isolate from Oil Contaminated Sites. *APCBEE Procedia.* 2013;5:237-41. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212670813000420>
44. Liu Y, Li C, Huang L, He Y, Zhao T, Han B, et al. Combination of a crude oil-degrading bacterial consortium under the guidance of strain tolerance and a pilot-scale degradation test. *Chin J Chem Eng.* 2017;25(12):1838-46. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1004954116311740>
45. Akbari V, Pandya R, Singh S. Extraction of the metagenomic DNA and assessment of the bacterial diversity from the petroleum-polluted sites. *Environ Monit Assess.* 2014;186(10):6351-62. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10661-014-3859-6>
46. Dasgupta A, Handique P, Saikia R. A Rapid and Effective Method for Extraction of Bacterial DNA From Crude Oil-Contaminated Soil. *Curr Sci.* 2018;115(2):211. Disponible en: <https://www.currentscience.ac.in/Volumes/115/02/0211.pdf>

ANEXOS

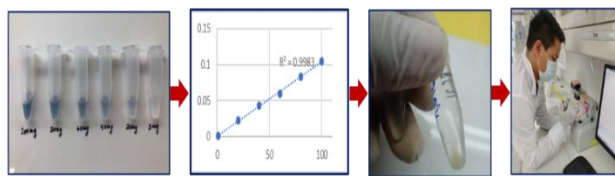
Anexo 1: Flujograma resumido de procedimientos realizados



Colecta de muestra y cultivo de consorcios microbianos

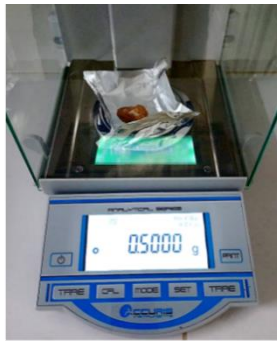


Evaluación de crecimiento y verificación de la presencia de microorganismos



Análisis del contenido de polifenoles totales

Anexo 2: Obtención y cultivo de consorcios microbianos



Pesaje de las muestras de suelo



Muestras colocadas en medio BH y petróleo



Transferencia de cultivo inicial a medio BH y HAPs



Cultivo en medio BH y petróleo



Cultivo en medio BH y HAPs

Anexo 3: Curva de calibración de polifenoles totales

mg/L Ácido gálico	Absorbancia 765 nm
100	0,105
80	0,083
60	0,06
40	0,043
20	0,023
1	0,001

