



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

**INFORME DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA AMBIENTAL**

MECANISMO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE DIÉSEL MEDIANTE
Bacillus sp. ANTÁRTICOS**

AUTORAS:

**DAYANA MERCEDES PALACIOS GARCÍA
MARÍA CONCEPCIÓN ZAMBRANO MOREIRA**

TUTORA:

BLGA. MARÍA FERNANDA PINCAY CANTOS, MG

CALCETA, JUNIO DE 2023

DECLARACIÓN DE AUDITORÍA

DAYANA MERCEDES PALACIOS GARCÍA, con cédula de ciudadanía **1316466091** y **MARÍA CONCEPCIÓN ZAMBRANO MOREIRA**, con cédula de ciudadanía **1312112830**, declaramos bajo juramento que el Trabajo de Integración Curricular titulado: “**Evaluación de la degradación de diésel mediante *Bacillus sp. Antárticos***” es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la siguiente declaración, conferimos a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra con fines académicos, preservando a nuestro favor, todos los derechos patrimoniales de autoría alusivos al presente trabajo de investigación, en conformidad con el Artículo 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los conocimientos, Creatividad e Innovación.



**DAYANA MERCEDES
PALACIOS GARCÍA**

C.C: 1316466091



**MARÍA CONCEPCIÓN
ZAMBRANO MOREIRA**

C.C: 1312112830

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

DAYANA MERCEDES PALACIOS GARCÍA, con cédula de ciudadanía **1316466091** y **MARÍA CONCEPCIÓN ZAMBRANO MOREIRA**, con cédula de ciudadanía **1312112830**, autorizamos a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”, la publicación en la biblioteca de la institución del Trabajo de Integración Curricular titulado: “**Evaluación de la degradación de diésel mediante *Bacillus sp. Antárticos***”, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra exclusiva responsabilidad y total autoría.



**DAYANA MERCEDES
PALACIOS GARCÍA**

C.C: 1316466091



**MARÍA CONCEPCIÓN
ZAMBRANO MOREIRA**

C.C: 1312112830

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

MARÍA FERNANDA PINCAY CANTOS, certifica haber tutelado el trabajo de Integración Curricular titulado: “**Evaluación de la degradación de diésel mediante *Bacillus sp. Antárticos***”, que ha sido desarrollado por **DAYANA MERCEDES PALACIOS GARCÍA** y **MARÍA CONCEPCIÓN ZAMBRANO MOREIRA**, previo a la obtención del título de **INGENIERA AMBIENTAL**, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”.

BLGA. MARÍA FERNANDA PINCAY CANTOS, MG.

C.C: 0921757282

TUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del Tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el Trabajo de Integración Curricular titulado: “**Evaluación de la degradación de diésel mediante *Bacillus sp. Antárticos***”, que ha sido desarrollado por **DAYANA MERCEDES PALACIOS GARCÍA** y **MARÍA CONCEPCIÓN ZAMBRANO MOREIRA**, previo a la obtención del título de **INGENIERA AMBIENTAL**, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”.

MG. JOSÉ MIGUEL GILER MOLINA

C.C: 1310656762

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MG. JOFFRE ANDRADE CANDELL

C.C: 1311651390

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MG. ADRIANA VERGARA AUQUILLA

C.C: 1714516307

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

Al ser supremo, Dios, por haberme acompañado durante mi proceso de preparación profesional, por darme la sabiduría, las fuerzas necesarias y aquellos empujoncitos en los momentos más difíciles.

De manera especial, a mis padres y hermanos, por el apoyo que desde siempre me han brindado, por ser sin duda alguna los que han cultivado en mí las ganas de ser mejor cada día y crecer profesionalmente.

A aquellos catedráticos, que fueron motivación y ejemplo por el cual reforcé mi entusiasmo y amor hacia la carrera con la que me he preparado de forma facultativa hasta el día de hoy.

A mi compañera de tesis, Concepción Zambrano por formar parte de la autoría de la presente investigación.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”, por haber sido el centro de instrucción superior y a cada uno de los docentes que contribuyeron en mi proceso de aprendizaje.

A nuestra tutora Blga. María Fernanda Pincay, por su paciencia e instrucción en el desarrollo del presente trabajo.

DAYANA MERCEDES PALACIOS GARCÍA

AGRADECIMIENTO

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional. A cada familiar y conocido que estuvo pendiente y presente. A mis amigas y compañeras Pamela Solórzano Y Karla Mero por siempre estar. A mi compañera de tesis Dayana Palacios por ser parte fundamental de este trabajo. A cada compañero que estuvo en cada momento de mi vida universitaria. A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí “Manuel Félix López” por darme la oportunidad de formarme como profesional. A cada uno de los docentes que supieron transmitir sus conocimientos en cada clase. A mi tutora María Fernanda Pincay por ser esa guía para poder culminar este trabajo de investigación.

MARÍA CONCEPCIÓN ZAMBRANO MOREIRA

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado de manera especial a mis padres Teresa García y Francisco Palacios, quienes con su esfuerzo han sido el soporte fundamental durante toda mi trayectoria académica, por ser mi motivo principal de superación y guiar cada uno de mis pasos.

A mis hermanos: Beatriz, Jenny, Javier, Lizandro y Mauricio, por su gran apoyo y confianza en mí, por brindarme la motivación necesaria para enfrentar grandes retos y cumplir cada uno de mis objetivos.

A mi sobrino Stalin, que ha sido como un hermano más, por su convertirse en mi compañía y resguardo incondicional, por el cual me esfuerzo en ser mejor cada día y convertirme en su ejemplo.

A aquellos seres tan especiales que han formado parte de mi vida, por haber sido la inspiración por la cual nació el amor a mi carrera profesional, y demostrarme el valor de la vida y de su protección en todos los ámbitos.

DAYANA MERCEDES PALACIOS GARCÍA

DEDICATORIA

A mi familia: mis padres Deisi Moreira y José Zambrano; mis hermanos Jesús, María José y Luis; mi sobrino Benjamín y mi querida Tita por estar conmigo y apoyarme en cada momento.

MARÍA CONCEPCIÓN ZAMBRANO MOREIRA

CONTENIDO GENERAL

PORTADA.....	i
DECLARACIÓN DE AUDITORÍA	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN	iii
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	v
AGRADECIMIENTO	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
DEDICATORIA	ix
CONTENIDO GENERAL	x
CONTENIDO DE TABLAS	xiii
CONTENIDO DE ECUACIONES.....	xiii
CONTENIDO DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS.....	3
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	3
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
1.4. HIPÓTESIS.....	4
1.4.1. HIPÓTESIS ALTERNATIVA.....	4
1.4.2. HIPÓTESIS NULA	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. PETRÓLEO	5
2.1.1. ORIGEN	5
2.1.2. IMPORTANCIA EN LA SOCIEDAD	5
2.2. HIDROCARBUROS.....	6
2.2.1. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE LOS HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO.....	6
2.2.2. HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS.....	6
2.2.3. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS	7

2.2.4.	DIÉSEL	7
2.3.	CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR HIDROCARBUROS	8
2.4.	REMEDIACIÓN	9
2.5.	MÉTODOS DE DEGRADACIÓN	9
2.6.	TIPOS DE DEGRADACIÓN BIOLÓGICA	10
2.6.1.	BIORREMEDIACIÓN.....	10
2.6.2.	FITORREMEDIACIÓN	10
2.6.3.	DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA	11
2.6.4.	BIODEGRADACIÓN	11
2.6.4.1.	FACTORES AMBIENTALES QUE INFLUYEN EN LA BIODEGRADACIÓN... 12	
-	Condición química y complejidad del contaminante: grado de susceptibilidad del hidrocarburo, determinante del crecimiento y evolución microbiana.....	12
-	Estado del cultivo: concentración original de las unidades fundamentales de los organismos vivos y condicionantes fisicoquímicos como oxígeno disuelto y temperatura.	12
-	Modificaciones en: proporción de nutrientes y fuentes de carbono, pH, temperatura.	12
-	Cinética de crecimiento: control de nutrientes e intensificación de productos procedentes del metabolismo microbiano.	12
2.7.	MICROORGANISMOS EN LA ANTÁRTIDA.....	12
2.8.	MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR DIÉSEL	13
2.9.	BACTERIAS PSICRÓFILAS	13
2.10.	Bacillus.....	13
2.10.1.	TAXONOMÍA	14
2.10.2.	MORFOLOGÍA	14
2.11.	CLASIFICACIÓN DE Bacillus.....	15
2.11.1.	<i>Bacillus cereus</i>	15
	Se trata de un bacilo Gram positivo, anaerobio, facultativo y con presencia de flagelos peritricos que permiten su movilidad, poseen bordes redondeados con capacidad de formar cadenas cortas	15
2.11.2.	<i>Bacillus anthracis</i>	16
	Es un bacilo Gram positivo de apariencia recta, visto al microscopio, son de gran tamaño (1 x 3 a 8.....	16
2.11.3.	<i>Bacillus wiedmannie</i>	16
2.11.4.	<i>Bacillus tropicus</i>	16
	Es una bacteria Gram positiva, aerobia, anaerobia, facultativa con forma de varilla, cuenta con flagelos peritricos que permiten su movilidad. Se distingue por su	

capacidad formadora de esporas que crean colonias circulares de color blanquecino y una longitud celular de 2,2 a 2,5	16
2.11.5. <i>Bacillus paramycoides</i>	16
2.12. CULTIVO DE MICROORGANISMOS	17
2.12.1. MEDIOS DE CULTIVO	17
2.12.2. CLASIFICACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	17
2.13. PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN	18
2.13.1. MICROSCOPIO ÓPTICO	18
2.13.2. RECUENTO EN PLACA DE SUPERFICIE.....	19
2.13.3. PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN	19
CAPÍTULO III. DISEÑO METODOLÓGICO.....	20
3.1. UBICACIÓN	20
3.2. DURACIÓN.....	20
3.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	20
3.4. MÉTODOS.....	21
3.4.1. MÉTODO BIBLIOGRÁFICO	21
3.4.2. MÉTODO ANALÍTICO.....	21
3.4.3. MÉTODO ESTADÍSTICO	21
3.5. TÉCNICAS.....	21
3.5.1. BIODEGRADACIÓN.....	21
3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL	23
3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	23
3.7.1. FASE 1. REACTIVACIÓN DE BACTERIAS <i>Bacillus</i> sp COMO MEDIO BIODEGRADADOR DE DIÉSEL	23
3.7.2. FASE 2. DETERMINAR EL POTENCIAL DE BIODEGRADACIÓN DE <i>Bacillus</i> sp CON RELACIÓN AL TIEMPO DE RESPUESTA.	27
3.8. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1. FASE I. REACTIVACIÓN DE BACTERIAS <i>Bacillus</i> sp. COMO MEDIO BIODEGRADADOR DE DIÉSEL	29
4.1.1. REACTIVACIÓN DE BACTERIAS.....	29
4.1.2. ACONDICIONAMIENTO DE <i>Bacillus</i> sp AL DIÉSEL	29
4.1.3. CULTIVO Y CRECIMIENTO DE <i>Bacillus</i> sp	31
4.2. FASE II. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE BIODEGRADACIÓN DE <i>Bacillus</i> sp CON RELACIÓN AL TIEMPO DE RESPUESTA	31

4.2.1. EVALUACIÓN AL HALO EN DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE LAS CEPAS BACTERIANAS POR 24, 48 Y 72 HORAS	31
4.2.2. ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN.....	36
4.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE BIODEGRADABILIDAD	38
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
5.1. CONCLUSIONES.....	43
5.2. RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA	45
.....	64
ANEXOS	64

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 2.1. Taxonomía de <i>Bacillus sp.</i>	14
Tabla 3.1. Caldo Nutritivo	23
Tabla 3.2. Medio de Sales Minerales.....	25
Tabla 3.3 Tratamientos (cepas) con respecto al tiempo de estudio.....	26
Tabla 3.4. Fuente de variación del análisis de varianza.....	26
Tabla 4.1. Resumen del análisis de varianza (ANOVA).....	39
Tabla 4.2. Test: Tukey Alfa= 0,05 DNS=0, 12192- Error: 0,0019 gl: 8.....	40
Tabla 4.3. Test: Tukey Alfa= 0,05 DNS=0, 07811- Error: 0,0019 gl: 8.....	41

CONTENIDO DE ECUACIONES

Ecuación 2.1. Porcentaje De Biodegradación	19
Ecuación 3.1. Halo De Degradación	22
Ecuación 3.2 Área de la caja de Petri	22

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 4.1. Morfología de <i>Bacillus sp</i> de las cepas GA-52, T-29, T-13, T-21, DEE-71	30
Figura 4.2. Media de crecimiento del halo bacteriano (mm) con respecto al tiempo (h).....	32

Gráfico 4.3. Media de crecimiento del halo de colonias por cepa en diferentes períodos	34
Gráfico 4.4. Porcentaje de biodegradación de diésel por cada cepa con respecto al tiempo.....	34

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la capacidad de biodegradación del hidrocarburo de petróleo (diésel) mediante la aplicación de *Bacillus* sp aislados de la Antártida. El estudio se desarrolló bajo el modelo experimental Diseño De Bloques Completamente Al Azar (DBCA) unifactorial con tres bloques, conformado por cinco tratamientos (cepas) con tres repeticiones en cada período (24, 48 y 72 horas) con un total de 45 unidades experimentales. Las cepas aisladas fueron adaptadas a un medio de sales minerales enriquecido con diésel bajo condiciones controladas. Se evaluó el halo de degradación efectuado por cada una de las cepas, suministrando diésel como única fuente de carbono. El análisis estadístico se efectuó mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para determinar diferencias significativas. Los porcentajes de biodegradación más representativos fueron de 52% (GA-52); 43% (T-29) y 39% (T-21). En conclusión, el tratamiento GA-52 tiene una capacidad mayor de degradar diésel en comparación con las otras cepas estudiadas bajo las condiciones controladas en el presente experimento.

Palabras clave: *Bacillus* sp. biodegradación, halo de crecimiento, diésel, potencial

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the biodegradation capacity of petroleum hydrocarbons (diesel) through the application of *Bacillus* sp isolated from Antarctica. The study was carried out under the completely randomized block design experimental model (DBCA) unifactorial and three blocks made up of five treatments (strains) with three repetitions in each period (24, 48 and 72 hours) with a total of 45 units experimental. The isolated strains were adapted to a medium of mineral salts enriched with diesel under controlled conditions. The halo of degradation carried out by each one of the strains evaluated, supplying diesel as the only carbon source. Statistical analysis was carried out using an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test to determine significant differences. The most representative biodegradation percentages were 52% (GA-52); 43% (T-21) and 39% (T-13). In conclusion, the GA-52 treatment has a higher capacity to degrade diesel compared to the other strains studied under the controlled conditions in the present experiment.

Key words: *Bacillus* sp., biodegradation, growth halo, diesel, potential.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Alrededor del mundo las actividades de exploración y explotación de hidrocarburos han significado uno de los mayores impulsos en la industria petrolera por la importancia del elemento en la vida cotidiana. Debido a la alta demanda del petróleo, su producción, transporte y refinamiento, ha aumentado en un 6,5% (Miranda et al., 2017; Morrow, 2021).

Uno de los derivados más utilizados es el diésel, en la industria automotriz y de maquinaria, lo que implica la liberación de hidrocarburos, compuestos parafínicos, naftalénicos y aromáticos en la atmósfera (Pérez, 2018). En materia de combustibles fósiles, se trata de la fuente principal para producción de energía con un 90%, de la cual se provee a más del 50% de la civilización (Refinería Petróleos de Escombreras, España, 2019).

Las diferentes técnicas para la explotación de hidrocarburos tienen alta repercusión en suelo y agua por las difusiones que ocurren y la composición de este material (Cabana, 2020). Según estimaciones, un galón de combustible diésel (3,7 litros) puede contaminar aproximadamente 50 millones de litros de agua por la velocidad de infiltración (2,165 m/min), superior a la del agua en suelos con alta permeabilidad (Ramirez et al., 2017).

Un informe realizado por Ortiz y Silva (2019) demuestra que alrededor de 2,5 millones de lugares en Europa se encuentran con altos niveles de contaminación por actividades petroleras; a lo cual se suman también países Latinoamericanos que durante los últimos 20 años reportan un incremento en las áreas contaminadas por hidrocarburos procesados del petróleo como consecuencia de derrames ocurridos y actividades propias de la industria (Cavazos et al., 2017).

En Ecuador, durante los años 2000-2014 se han registrado un total de 539 derrames, entre petróleo (crudo) y diésel en el oriente ecuatoriano (Cherry, 2018). En 2009 producto de un deslizamiento de tierra, un tramo del Oleoducto de Crudos

Pesados se agrietó, suscitando el derrame de 11 700 barriles en el río Santa Rosa, provincia de Napo, uno de los más grandes en la región (Lafuente et al., 2019).

Por otra parte, Zarate (2018) expresa que el contaminante más significativo proveniente del diésel a escala nacional es el azufre; sus concentraciones se encuentran por encima de los estándares internacionales, regionales y locales, las cuales llegan hasta 5000 ppm en ciudades como El Coca (Chuquer et al., 2018). A ello se atribuyen registros de datos que demuestran el vertido de 1400 barriles en el río de la misma localidad (Vizueté et al., 2019).

Es por ello que, hoy en día se consideran las técnicas biorremediadoras de aislamiento con bacterias una opción viable para la recuperación de áreas afectadas por derrames de diésel y gasolina (Instituto Antártico Ecuatoriano, 2019), microorganismos que trabajan bajo condiciones antárticas, y que, gracias al proceso enzimático que desarrollan permite que consuman el elemento como fuente de carbono y lo degraden, minimizando el nivel de impacto (Galliazzi, 2017).

Ante la problemática expuesta, el presente trabajo de investigación está basado en evaluar la facultad que tienen los *Bacillus* sp aislados previamente en la Antártida- en la degradación de diésel. En función de ello, se plantea la interrogante: ¿Cuál será la capacidad de degradación de las bacterias antárticas sobre el diésel?

1.2. JUSTIFICACIÓN

El empleo de hidrocarburos ha aportado un gran impulso en términos de modernización, por los múltiples usos y las facilidades que confiere al ser humano en las actividades cotidianas (Patiño, 2021). La demanda que existe con respecto al uso de productos que dependen de éstos, especialmente el diésel que es utilizado como combustible y con propósitos energéticos, implica una sobreexplotación del recurso y un sinnúmero de afectaciones ambientales que se generan producto de ello y de su aplicación (Chenaut, 2018).

En el ámbito ambiental, la presente investigación involucra el estudio de bacterias como fuente biodegradadora de diésel, dada la habitual contaminación directa e indirecta que se produce a partir de derrames del hidrocarburo (Garzón et al., 2017). Durante los últimos años, se han destacado alternativas biorremediadoras con aplicación de microorganismos, los cuales cuentan con el potencial para la degradación de sustancias tóxicas, entre éstas aquellas derivadas del petróleo (Vizúete et al., 2019). Estudiar los mecanismos que generan y subyacen a la biodiversidad microbiana es clave para predecir la respuesta de los ecosistemas a los cambios ambientales (Pincay, 2022)

La utilización de bacterias constituye una de las tecnologías biorremediadoras menos costosas y viables en cuanto a degradación de hidrocarburos de petróleo (diésel y gasolina) por la alta capacidad natural que tienen de consumirlos como fuente energética para su metabolismo y degradarlos gracias a sus procesos enzimáticos (Hoyos y Sánchez, 2017).

Desde lo legal y social, el estudio toma como base la Constitución de la República del Ecuador (2008), específicamente el Art.14 donde indica “Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*” además del anexo “Plan de Creación de Oportunidades 2021-2025”, Objetivo 3, donde estipula “Garantizar los derechos de la naturaleza para las actuales y futuras generaciones” (Secretaría Nacional de Planificación, 2021)

Bajo el marco expuesto, se prevé el desarrollo del presente trabajo, mediante el cual se pretende evaluar la degradación de diésel aplicando *Bacillus* sp. aislados de la Antártica.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la degradación del hidrocarburo de petróleo (diésel) mediante aplicación de *Bacillus* sp. aislados de la Antártida.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reactivación de bacterias *Bacillus* sp. Antártidas como medio biodegradador de diésel.
- Determinación del potencial de biodegradación de *Bacillus* sp con relación al tiempo de respuesta.

1.4. HIPÓTESIS

1.4.1. HIPÓTESIS ALTERNATIVA

Algunas de las cepas de *Bacillus* sp aisladas de la Antártida demuestran la capacidad de degradar diésel hasta en un 30%.

1.4.2. HIPÓTESIS NULA

Ninguna de las cepas de *Bacillus* sp aisladas de la Antártida presentan la facultad de degradar diésel.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. PETRÓLEO

Compuesto químico constituido por carbono e hidrógeno, obteniendo una mezcla aceitosa que derivan desde alcanos simples hasta hidrocarburos más complejos (Santos, 2020). Su formación se origina a raíz de la descomposición de sustancias orgánicas derivadas por la acción de microorganismos durante el aumento de la temperatura, en un periodo de tiempo y bajo presión (Goya, 2020).

El petróleo crudo es una mezcla de hidrocarburos que contiene una pequeña fracción de moléculas orgánicas heteroatómicas que contienen nitrógeno, azufre y oxígeno, y trazas de elementos como el níquel y el vanadio. Sin embargo, la composición del petróleo varía con la ubicación y la edad del campo de petróleo, así como la profundidad del pozo de petróleo (Constanza et al., 2019).

2.1.1. ORIGEN

Su origen radica en el momento en que se creó un producto derivado del petróleo como es el queroseno, este era utilizado para iluminar casas aproximadamente en el año 1859 (Cornejo, 2019). Años más tarde en 1885 con la invención del automóvil se creó un subproducto procedente del petróleo denominado gasolina, que hasta la actualidad sirve como fuente principal que alimenta el motor del vehículo (Mora, 2019).

2.1.2. IMPORTANCIA EN LA SOCIEDAD

Por sus variadas aplicaciones en la actualidad el petróleo es considerado como un producto básico, principal e importante de todo el mundo (Mirre, 2018). Es utilizado como fuente primaria para la producción de productos refinados, como casi todos los productos que conocemos, como plásticos, fertilizantes, detergentes, pinturas, medicamentos, en el transporte en general y principalmente como fuente de energía, entre otras (Brambila et al., 2019).

Ortuño (2010) estipula que actualmente se emplea más de 97,2 millones de barriles de crudo a nivel mundial, estima que aproximadamente 100 países son productores de este.

2.2. HIDROCARBUROS

Sustancias orgánicas presentes en estado líquido, sólido o gaseoso, constituidas principalmente por hidrógeno y carbono (Morante, 2018). Hoy en día los hidrocarburos al representar una fuente de energía importante para el ser humano, conlleva a la transformación del crudo en subproductos de consumo diario (Jiménez, 2020). De los hidrocarburos resultan otras sustancias orgánicas, tal como el combustible fósil.

2.2.1. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE LOS HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO

Hidrocarburos de Petróleo es el nombre que se le da a una gama muy amplia de productos químicos que componen el petróleo y sus productos refinados: gasolina y diésel (Ortuño, 2010). La composición de estos la constituyen mayormente átomos de carbono (76-86%) e hidrógeno (10-14%), es una mezcla de gases, líquidos y sólidos, con cantidades variables de otros elementos como: nitrógeno, oxígeno, azufre, hierro, níquel, vanadio u otros metales (Goya, 2020).

Esta mezcla representa características químicas comunes e importantes al momento de evaluar los impactos potenciales del material en caso de derrames. Ciertos grupos de productos químicos dentro de los hidrocarburos de petróleo presentan peligros toxicológicos específicos, por ejemplo, los hidrocarburos alifáticos y aromáticos (Hajabbasi, 2016).

2.2.2. HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS

Los hidrocarburos alifáticos pertenecen a la fracción más abundante en el petróleo crudo. Son compuestos que contienen carbono e hidrógeno unidos en cadenas lineales, trenes ramificados o anillos no aromáticos, pueden estar saturados (hexano y otros alcanos) o insaturados (hexeno y otros alquenos y alquinos) (Constanza et al., 2019).

El hidrocarburo alifático más simple es el metano, CH₄. Además del hidrógeno, otros elementos pueden unirse a los átomos de carbono en la cadena, incluidos oxígeno, nitrógeno, cloro y azufre. La mayoría de los hidrocarburos alifáticos son inflamables (Hernández et al., 2017).

2.2.3. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS

Se tratan de complejos cuyas moléculas poseen características aromáticas y están presentes en la mayoría de mezclas del petróleo (Wang et al., 2019). Son compuestos que contienen uno o más anillos aromáticos, como el benceno de un solo anillo a los que se unen átomos de hidrógeno” (Speight, 2016).

El benceno, el tolueno, el etilbenceno y los xilenos son los contaminantes más volátiles y solubles en agua (Mojiri et al., 2019). En condiciones estándar, el benceno, el tolueno y el xileno se encuentran en forma líquida, mientras que los compuestos aromáticos superiores, como el naftaleno, se presentan como sólidos aislados, pero se disuelven para formar una solución líquida con compuestos aromáticos simples (Constanza et al., 2019).

Los hidrocarburos aromáticos inhiben el crecimiento microbiano del suelo más que los hidrocarburos alifáticos.

2.2.4. DIÉSEL

El diésel es un combustible de alta densidad energética que se utiliza para impulsar muchos motores térmicos, incluidos automóviles, camiones y generadores diésel (Medina y Xiao, 2018). Compuesto por una mezcla de hidrocarburos, específicamente de derivados de hidrocarburos saturados (hidrocarburos de parafina, incluidas n-parafinas, isoparafinas y cicloparafinas) y derivados de hidrocarburos aromáticos (alquilbenecenos) y derivados de naftaleno (Speight, 2016).

El combustible diésel se refina a partir de petróleo crudo, el cual, en su formulación tradicional, produce mayores cantidades de ciertos contaminantes como azufre y partículas sólidas de carbono (Hosseinzadeh et al., 2018). Bajo la amplia definición de combustibles diésel, existen muchas combinaciones

posibles de características (como volatilidad, calidad de ignición, viscosidad, gravedad, estabilidad, entre otras propiedades (Sarathy et al., 2018). El diésel tiene un punto de ebullición más alto que la gasolina, pero un punto de ebullición más bajo que el gasóleo (Medina y Xiao, 2018).

2.3. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR HIDROCARBUROS

Los productos derivados del petróleo son la principal fuente de energía para la industria y la vida diaria, sin embargo, además de las emisiones asociadas con la quema de combustibles fósiles, durante la exploración, producción, refinación, transporte y almacenamiento de petróleo crudo y productos derivados del petróleo, se puede producir un derrame ocasionando así un impacto negativo en el medio contribuyendo a la contaminación ambiental (Forero, 2020; Andrade et al., 2017).

Velásquez (2017) en su investigación establece que hay que recalcar que la contaminación producida por el petróleo también guarda relación con actividades diversas como: el transporte marítimo, la pesca, verter los residuos de aceites u otros combustibles en lugares inapropiados, entre otras.

En el caso de haber derrames o fugas de hidrocarburos de manera directa en masas de agua, algunas fracciones permanecen en la superficie formando una delgada capa flotante. Las otras fracciones, que suelen ser más densas, se acumulan en el fondo del sedimento afectando a la biota existente y al resto de organismos que depredan la fauna bentónica (Ortuño, 2010).

Por otro lado, el derrame en suelo ocasiona toxicidad directa en los organismos que ahí habitan, reducción en la retención de humedad y de nutrientes, compactación, salinidad y alteraciones en el pH. Además, estos contaminantes pueden filtrarse hasta llegar a aguas subterráneas y a su vez transferirse por escorrentías (Morante, 2018).

Para Goya (2020) en los últimos años se ha encontrado soluciones que ayudan a mitigar o a controlar la contaminación producida por los derrames de hidrocarburos, una de ellas es la remediación empleada para el tratamiento de un medio contaminado haciendo uso de microorganismos.

2.4. REMEDIACIÓN

Conjunto de técnicas cuyo principal objetivo radica en la recuperación de suelos o cuerpos de agua que se encuentran contaminados, de cierta forma conservando o mejorando sus características para poder tener un equilibrio en entre plantas, animales y el ser humano, aquella que puede eliminar o mitigar contaminantes de una manera segura y oportuna (Martínez et al., 2019).

En ella se dispone implementar procesos que ofrecen soluciones sistemáticas potenciales para la mayoría de contaminantes presentes en determinados ecosistemas, pueden ser químicas, físicas y/o biológicas.

2.5. MÉTODOS DE DEGRADACIÓN

Con el paso del tiempo, a causa de la frecuencia con la que ocurren derrames y por la alta capacidad contaminante de hidrocarburos, se han implementado medidas que permitan su degradación, en función a ello Loera et al. (2016) describen las más destacadas:

- **Degradación Física:** Se basa en la modificación de la estructura del medio contaminado, por lo general, agua. En este tipo de método destaca la adsorción mediante contacto con un medio sólido: carbono activado, biochar, mineral de arcilla, membranas, sedimentos, celulosa y arena; el cual consiste en la retención/eliminación del contaminante (adsorbato) una vez entra en contacto con la superficie sólida (adsorbente).
- **Degradación Química:** Consiste en la utilización de solventes como medios degradadores, con intervención de radicales hidroxilos de alta capacidad reactiva, producidos durante la oxidación avanzada con ozono, cloro y dióxido de cloro.
- **Degradación Biológica:** Proceso que emplea organismos vivos capaces de degradar contaminantes, biotransformándolos en metabolitos menos complejos mediante actividad enzimática y mineralización, agua (H₂O), dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄).

2.6. TIPOS DE DEGRADACIÓN BIOLÓGICA

Los microorganismos juegan un rol importante en el ciclaje de nutrientes, descomposición de desechos y/o residuos de diferente naturaleza y en la desnaturalización de sustancias que contaminan el ambiente (Usón et al., 2010).

Alegando a la importancia de éstos en el ecosistema, en los últimos años se ha visto la necesidad de implementarlos de tal forma ayuden a depurar los contaminantes que yacen en el medio ambiente.

2.6.1. BIORREMEDIACIÓN

Tecnología de biorrecuperación en la que se emplean técnicas de tratamiento biológico, la forma de descontaminación de ambientes naturales previamente sépticos se fundamenta en la digestión de las sustancias orgánicas por los microorganismos, sustancias que actúan como fuente de carbono necesaria para el crecimiento de sus células y fuente de energía para llevar a cabo las funciones metabólicas que requieren estos organismos para su crecimiento, desarrollo y multiplicación (Brutti et al., 2018).

Cabe recalcar que los microorganismos a utilizar pueden ser propios del lugar o provenientes de otro ecosistema, estos se utilizan directamente en el foco de la contaminación donde pueden ser agregados o inoculados (Ruiz, 2019). Sin embargo, se requiere que el medio ofrezca ciertas condiciones fisicoquímicas y biológicas, ya que al ser un proceso que se basa en el crecimiento y actividad microbiológica, hay que considerar que para su efectividad es necesario tomar en cuenta parámetros ambientales aplicados que influyen en el crecimiento microbiano y la velocidad que tienen estos para degradar (Rodríguez et al., 2019).

2.6.2. FITORREMEDIACIÓN

Tecnología que hace uso de plantas o microorganismos que yacen en los tejidos de éstas y que no causan daño alguno a su huésped (relación simbiótica) con el objetivo de encontrar mejora en los procesos de fitorremediación, control biológico, crecimiento vegetal, entre otros (Martínez et al., 2019).

Este método incorpora el empleo de plantas y sus subproductos, simultáneamente microorganismos afiliados a estas para remover, degradar, transformar o secuestrar sustancias contaminantes del medioambiente terrestre o acuático y/o la restauración de la estructura y función de suelos que se encuentran contaminados (Brutti et al., 2018).

2.6.3. DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA

Proceso que emplea enzimas a partir de microorganismos capaces de metabolizar contaminantes. Dichos microorganismos disponen de su potencial enzimático para mineralizar o degradar los compuestos orgánicos hasta productos inocuos (Carvajal, 2020).

González (2021) determina que algunas enzimas pueden metabolizar simultáneamente otros compuestos como fuente de carbono por lo que hace más factible la biodegradación, estos procesos generalmente suelen darse a través de interacciones biogeoquímicas entre los componentes del suelo, agua, contaminantes y los propios o diferentes microorganismos.

2.6.4. BIODEGRADACIÓN

Proceso en la que interactúan microorganismos para descomponer de forma natural la materia o transformarla en compuestos simples, interviniendo procesos de oxidación y biodegradación simultánea en presencia o no de oxígeno por capacidad enzimática (Gómez y Sáiz, 2016; Pinto y Sánchez, 2018).

La biodegradación de hidrocarburos derivados del petróleo/diésel es el método ampliamente empleado por la viabilidad económica y sostenibilidad de su uso (Arenas y Rivera, 2020). El proceso se sustenta por la capacidad de organismos (microalgas, bacterias y hongos) en biotransformación de metabolitos menos complejos a través de la ruptura de estructuras moleculares, que luego son mineralizadas (López, 2016).

2.6.4.1. FACTORES AMBIENTALES QUE INFLUYEN EN LA BIODEGRADACIÓN

Durante el proceso de biodegradación de compuestos intervienen diversas variables que guardan relación con la capacidad de los organismos vivos como medios degradadores, por lo que según Gutiérrez (2018) entre éstas destacan:

- **Condición química y complejidad del contaminante:** grado de susceptibilidad del hidrocarburo, determinante del crecimiento y evolución microbiana.
- **Estado del cultivo:** concentración original de las unidades fundamentales de los organismos vivos y condicionantes fisicoquímicos como oxígeno disuelto y temperatura.
- **Modificaciones en:** proporción de nutrientes y fuentes de carbono, pH, temperatura.
- **Cinética de crecimiento:** control de nutrientes e intensificación de productos procedentes del metabolismo microbiano.

2.7. MICROORGANISMOS EN LA ANTÁRTIDA

La Antártida es una región donde se presentan condiciones extremas, como bajas temperaturas, poca o nula presencia de precipitaciones, alto grado de salinidad y formación natural de percloratos (contaminante emergente de origen antropogénico y/o natural que perjudica la biota y la salud humana) mismas que a su vez favorecen el crecimiento y desarrollo de bacterias nativas capaces de reducir dicho contaminante (Ortúzar et al., 2020).

Estos organismos son capaces de producir enzimas estables a la sal y conjuntamente capaces de tolerar y reducir ciertos contaminantes (en especial el perclorato) de manera eficiente en ambientes extremos, estos son los microorganismos extremófilos, psicrófilos - bacterias halófilas (Acevedo, 2021).

2.8. MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR DIÉSEL

Reyes (2020) reporta que la utilidad de hongos y bacterias en biodegradación es amplia, sin embargo, éstos últimos llevan ventaja, por ser los microorganismos más estudiados. La facultad que poseen para degradar hidrocarburos responde a la relación de sus complejos enzimáticos degradativos implicados en las rutas metabólicas de los compuestos contaminantes (Guerrero, 2018).

Entre los géneros destacados por el potencial degradador con diésel se encuentran *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Staphylococcus* y *Bacillus*, que además son muy empleados por tratarse de cepas cultivables que utilizan sus capacidades catabólicas (Castillo et al., 2020; Rabelo y Márquez, 2022).

2.9. BACTERIAS PSICRÓFILAS

Se tratan de microorganismos vivos que pueden desarrollarse a temperaturas por debajo de los 0°C hasta los 20°C (Villalta, 2017). El rango de temperatura, es variable para este grupo de bacterias y depende de la clasificación a la que pertenezcan; en el caso de psicrófilos obligados, se adaptan mejor a intervalos de 15-18°C, mientras que el rango óptimo de los psicrófilos facultativos es de 20 a 35°C, aunque pueden crecer hasta -5°C (Santos et al., 2017).

Las bacterias psicrófilas se encuentran en el Ártico y Antártida, predominan en superficies con permanencia de hielo y en los fondos del océano (Ramos, 2019). Se caracterizan, por la formación de enzimas que se desnaturalizan mediante un proceso poco tardío, condicionadas a temperaturas moderadas bajo las cuales pueden seguir desempeñando sus funciones, entre estas, degradadoras, gracias a las membranas adaptativas que poseen (Krasimirova, 2020).

2.10. Bacillus

El género *Bacillus* abarca una amplia extensión territorial en diferentes partes del mundo, distribuidas aproximadamente en 336 especies bacterianas, las cuales se las utilizan con múltiples fines en diferentes ámbitos, mediante el desarrollo de especies genéticamente modificadas (Villareal et al., 2018).

Las condiciones bajo las que crecen son variables, dependen de la especie y rasgos característicos, reaccionan favorablemente a temperaturas de 37°C y pH de 7, en escalas de laboratorio, al igual que a la tinción de Gram (Corrales, 2017). A pesar de la presencia en diversos ecosistemas, dominan el terrestre, por la presencia de sustratos orgánicos (Cruz et al., 2016).

Por la semejanza genética que las caracteriza, este género se agrupa por rasgos específicos, entre estos los relacionados con tipologías patógenas, *Bacillus cereus*; los ambientales, *Bacillus subtilis*, y uno de los que destaca, *Bacillus sp* (Realpe et al., 2019).

Se ha demostrado que los *Bacillus sp* se encuentran entre las cepas bacterianas capaces de crecer adaptadas a concentraciones elevadas de hidrocarburos de petróleo/diésel, sin embargo, otros géneros con particularidades similares son *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, cuya capacidad de degradación, al igual que la de todo microorganismo, dependerá de la naturaleza de los materiales compuestos en el diésel (Guzmán et al., 2016).

2.10.1. TAXONOMÍA

De acuerdo con Shibazaki et al. (2016) la clasificación taxonómica de los *Bacillus sp* está basada en paneles de identificación bioquímica y metabólica, la cual se evidencia en la siguiente tabla:

Tabla 2.1. Taxonomía de *Bacillus sp*.

Reino:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Bacillaceae
Género:	<i>Bacillus</i>

Fuente: (Shibazaki et al., 2016)

2.10.2. MORFOLOGÍA

Los *Bacillus* son un conjunto cohesionado, su forma es alargada y tienen una silueta de bastón (Verdesoto, 2018). El cuerpo de este género está cubierto parcialmente por flagelos, lo que les otorga movilidad, no obstante, a pesar de

poseer esta particularidad, otras especies de éste mismo grupo, son inmóviles (Úbeda et al., 2017).

Como medio tolerante a temperaturas extremas, poseen esporas y endosporas con un revestimiento que les permite su adaptabilidad, ya que pueden sobrevivir a la exposición temporal bajo temperaturas de ebullición, alrededor de 20 minutos (Morales y Muela, 2017). Se las encuentra en agua, suelo y como parte de materia viva en descomposición; la mayoría de especies en este grupo mantienen condiciones aerobias y estrictas, pero otras pueden desarrollar anaerobiosis facultativa (Acurio et al., 2021).

2.11. CLASIFICACIÓN DE *Bacillus*

En el primer grupo del género *Bacillus* se establece la clasificación en *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis*, los cuales a su vez incluyen en la agrupación a otras especies entre las que se encuentran *Bacillus anthracis*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus wiedmannii* y *Bacillus weihenstephanensis* (Onco, 2018). Este mismo autor menciona que actualmente se han incluido en el registro otras nuevas especies: *Bacillus paranthracis*, *Bacillus pacificus*, *Bacillus tropicus*, *Bacillus albus*, *Bacillus luti*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus nitratireducens* y *Bacillus paramycoides*.

Los principales representantes de este grupo son *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* por la afinidad genética que los cromosomas de estas bacterias representan, ya que sus cadenas de ARNr son casi idénticas; no obstante, cada una de estas especies muestran una patogenicidad diferente, además de distinguirse por sus características microscópicas y macroscópicas (Wang et al., 2019; Ming et al., 2023).

2.11.1. *Bacillus cereus*

Se trata de un bacilo Gram positivo, anaerobio, facultativo y con presencia de flagelos peritricos que permiten su movilidad, poseen bordes redondeados con capacidad de formar cadenas cortas (Realpe et al., 2019). Esta especie forma esporas resistentes a variaciones de condiciones del medio tales como altas

temperaturas, radiación, deshidratación y tolera procesos térmicos como la pasteurización, ya que su capacidad de crecimiento se encuentra entre rangos de temperatura de 4 °C hasta 48 °C y tolera concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) hasta en un 7% (Sánchez et al., 2016).

2.11.2. *Bacillus anthracis*

Es un bacilo Gram positivo de apariencia recta, visto al microscopio, son de gran tamaño (1 x 3 a 8 µm) con características de formación de esporas aerobio, anaerobio facultativo y capsulado, se identifica por sus bordes irregulares y el color de las colonias blancas o grises; tienen la capacidad de adherirse fácilmente al agar y no son hemolíticas, lo cual las hace diferentes de *Bacillus cereus* (Duery, 2014).

2.11.3. *Bacillus wiedmannie*

Tiene forma de bastón, con una longitud media de 2,8 µm y una anchura media de 1,2 µm, móvil con flagelos peritricos y su temperatura de crecimiento oscila entre 5 y 43 °C (Zhao et al., 2019). Produce endosporas elipsoidales que están ubicadas en el centro de la célula vegetativa, tienen esporangios no hinchados y posee la capacidad de hidrolizar caseína y almidón, además es anaeróbica facultativa (Miller et al., 2016).

2.11.4. *Bacillus tropicus*

Es una bacteria Gram positiva, aerobia, anaerobia, facultativa con forma de varilla, cuenta con flagelos peritricos que permiten su movilidad. Se distingue por su capacidad formadora de esporas que crean colonias circulares de color blanquecino y una longitud celular de 2,2 a 2,5 µm. Su temperatura de crecimiento se encuentra entre 15 – 45 °C (Liu et al., 2017).

2.11.5. *Bacillus paramycoides*

Posee forma de varilla, con una longitud celular de 1,8 a 2,2 µm y con un anchor de 0,8 a 1,2 µm. Crea colonias cerosas, circulares y no translúcidas. Por lo general crecen a temperaturas entre 15 y 39 °C. Son facultativamente

anaerobias, inmóviles, no poseen endosporas, capaz de hidrolizar almidón, leche desnatada y caseína (Liu et al.,2017).

2.12. CULTIVO DE MICROORGANISMOS

2.12.1. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo están asociados en microbiología, con soluciones compuestas por nutrientes que aportan al crecimiento y desarrollo de organismos vivos (bacterias, hongos, microalgas) bajo condiciones controladas en laboratorio, de las cuales dependerá su evolución y potencial una vez sean cultivados y aplicados con fines específicos (Rodríguez y Zhurbenko, 2018).

La multiplicación celular de los microorganismos está condicionada por las fuentes de energía proporcionadas, carbono, sales minerales y otros nutrientes, a lo cual se suman factores como temperatura, pH y disponibilidad de oxígeno, ya sea en ambientes naturales o artificialmente controlados, según sean sus requerimientos (Jiménez et al., 2018).

2.12.2. CLASIFICACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Garibaldi (2017) establece la clasificación de los medios de cultivos:

Según su estado físico:

- **Líquidos:** contienen sustratos diluidos en agua.
- **Sólidos:** incluyen gelificantes (agar, gelatina, sílica gel), usado en laboratorio para aislamiento de microorganismos.

Según la naturaleza de sus constituyentes:

- **Naturales:** conformados por sustancias de origen animal, vegetal con adición de complementos minerales.
- **Sintéticos:** a base de productos químicos. Su composición es pura, lo que permite conocer con exactitud las concentraciones de cada componente.

Según sus propósitos de uso

- **Enriquecidos:** constituidos por sustancias líquidas que aportan al crecimiento microbiano del organismo de interés o que, en efecto, inhiba el desarrollo de otros.
- **Selectivos:** se trata de medios sólidos con características concretas para el aislamiento microbiano.
- **Diferenciales:** contienen productos resultantes de la actividad metabólica de otros microorganismos sobre ciertos componentes del medio y se emplean para identificación de bacterias.

2.13. PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN

Las pruebas de biodegradación son utilizadas para determinar la biodegradabilidad que poseen ciertas sustancias químicas, miden el proceso bioquímico que ocurre cuando los microorganismos consumen un determinado tipo de material (Ayala, 2020).

La capacidad de biodegradación de un producto depende de la cantidad de carbono disponible para el consumo microbiano, los productos de prueba se evalúan en busca de propiedades químicas claves relacionadas con el contenido de carbono del material y luego se agregan a las cámaras de prueba del método para su análisis (Rasmussen et al., 2018).

2.13.1. MICROSCOPIO ÓPTICO

El microscopio óptico es un equipo que permite la observación de objetos o estructuras muy pequeñas, no visibles a simple vista (Gomes, 2019).

En microbiología, se trata de una herramienta mediante la cual se logra la identificación y cuantificación de distintos microorganismos, hongos, bacterias, microalgas y otros (Hernández, 2021), al igual que su caracterización morfológica y estructural, mediante la visualización del crecimiento o no de sus rasgos; además, permite controlar el fraccionamiento de alguno de los materiales de interés (Montalvo, 2018).

La constante utilización de este instrumento en estudios radica en la viabilidad que representa, por factores económicos y la facilidad de operación, además de la eficacia que superpone (Rodríguez, 2019).

2.13.2. RECUENTO EN PLACA DE SUPERFICIE

También conocida como recuento estándar en placa, recuento aerobio mesófilo, recuento total en placa o recuento de colonias aerobias (Mendonca *et al.*, 2020). Es una prueba que indica el número general de bacterias en una superficie, proporciona una estimación del número de microorganismos que pueden crecer aeróbicamente a temperaturas mesófilas (Knutson, 2020).

Los resultados del conteo en placa reflejan el número de colonias que pueden emerger bajo las condiciones físicas y químicas dadas (atmósfera, temperatura, pH, nutrientes disponibles, presencia de compuestos inhibidores del crecimiento) (Alsanius y Wohanka, 2019).

2.13.3. PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN

Aranzales (2017), se refiere a la evolución del porcentaje de degradación de una sustancia o elemento, considerada desde un área inicial con respecto al tiempo.

$$\% \text{ Biodegradación} = \frac{\text{Área del halo de degradación (mm}^2\text{)}}{\text{Área de la caja (mm}^2\text{)}} \times 100$$

Ecuación 2.1. Porcentaje De Biodegradación

CAPÍTULO III. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de biología molecular de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”, situada en el sitio “El Limón” de la ciudad de Calceta, Cantón Bolívar, provincia de Manabí.

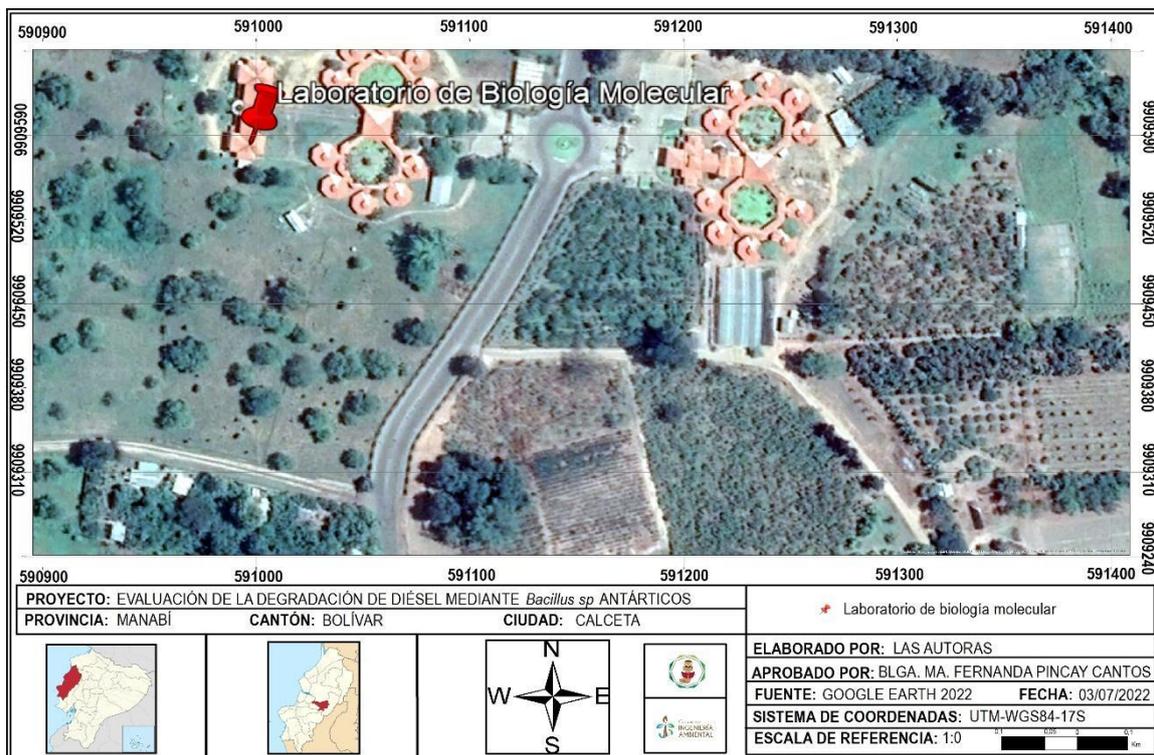


Figura 3. 1. Laboratorio de Biología Molecular ESPAM MFL.
Fuente: (Google Earth, 2022)

3.2. DURACIÓN

El tiempo establecido para el cumplimiento del trabajo de investigación fue de 9 meses, distribuidos cronológicamente acorde al calendario académico.

3.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El actual estudio reunió las cualidades prácticas necesarias para el tipo de investigación experimental, por lo que fue de este carácter, efectuándose bajo la manipulación, control de variables, crecimiento de halos bacterianos (*Bacillus*) y biodegradación del hidrocarburo de petróleo/diésel (Patiño et al., 2021).

3.4. MÉTODOS

3.4.1. MÉTODO BIBLIOGRÁFICO

A partir de este método se emplearon diversos medios que permitieron el acceso a información documentada con la finalidad de respaldar las actividades experimentales en estudios ya comprobados (Tramullas, 2020).

3.4.2. MÉTODO ANALÍTICO

Se desarrolló el método analítico para estudiar cada uno de los factores condicionantes del crecimiento y desarrollo de las cepas bacteriológicas degradadoras de diésel (Espinoza, 2020; Novaes et al., 2017).

3.4.3. MÉTODO ESTADÍSTICO

La aplicación del método estadístico se llevó a cabo para todo aquello que comprendió la utilización de matemáticas aplicadas, análisis de datos y su representación gráfica (Mendoza et al., 2017).

3.5. TÉCNICAS

3.5.1. BIODEGRADACIÓN

Consistió en la estimación del porcentaje de degradación realizado por las bacterias, relacionando el área de la caja utilizada para el cultivo con la dimensión de los halos de degradación medidos, los cuales dependieron directamente de las características del medio en función de los 3 tiempos de estudio (Aranzaes, 2017).

- **Estimación del área del halo de degradación:**

Con la ayuda de una regla milimetrada, se midió el diámetro del halo hidrólisis, formado alrededor de los discos inoculados en el cultivo, el cual se realizó mediante ojo al desnudo, midiendo desde la parte central del disco hasta el límite más amplio; las áreas se reconocieron por ser las zonas más claras dentro de la

muestra y sirvieron como referencia para la estimación del diámetro de colonia (Holguín et al., 2017; Morales, 2019).

De acuerdo con lo propuesto por Mikán y Castellanos (2019) posterior a ello, se procedió a la aplicación de la fórmula para el cálculo correspondiente al halo de degradación mediante la fórmula:

$$A - B = C$$

Ecuación 3.1. Halo De Degradación

Donde:

A: Sumatoria entre el diámetro de la colonia y el halo de hidrólisis

B: Diámetro de la colonia

C: Resultado equivalente al halo de degradación

- **Cálculo del área de la caja de Petri**

Se realizó midiendo el diámetro de la caja en su posición más amplia, con ayuda de una regla graduada, el valor obtenido se dividió a la mitad para determinar el radio y éste se multiplicó por sí mismo; el resultado se multiplicó por el valor de Pi (Flores, 2016).

$$A = \pi \times r^2$$

Ecuación 3.2 Área de la caja de Petri

Donde:

A: Área de la caja de Petri

π : Relación entre la longitud de la circunferencia y su diámetro (3,1415)

r: radio

- Cálculo de biodegradación

Con los datos obtenidos de los cálculos previos, se determinó el porcentaje de degradación de las cepas, aplicando la fórmula (Ecuación 2.1) propuesta por Aranzales (2017).

3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de la investigación se consideraron un total de 45 unidades experimentales, compuestas por cinco tratamientos y tres repeticiones respectivamente, distribuidas de manera uniforme para los 3 períodos de tiempo establecidos (24, 48 y 72 horas) (Petit et al., 2016), lo que correspondió a nueve unidades experimentales por cada tratamiento. Estas fueron conformadas por diferentes cepas (tratamientos) y misma proporción de diésel en estado puro.

3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO

3.7.1. FASE 1. REACTIVACIÓN DE BACTERIAS *Bacillus* sp COMO MEDIO BIODEGRADADOR DE DIÉSEL

3.7.1.1. ACTIVIDAD 1. PREPARACIÓN DE CALDO NUTRIENTE

El caldo nutritivo se utilizó como fuente de carbono y nitrógeno dispensable para el adecuado desarrollo y crecimiento de bacterias (Elles, 2018). Para la preparación se fundamentó en la metodología de (Mazeed et al., 2020):

En un 1 litro de agua destilada contuvo las siguientes composiciones:

Tabla 3.1. Caldo Nutritivo

Compuesto	Cantidad (g/l)
Peptona	6
Cloruro de sodio	5
Extracto de levadura	2
Extracto de carne	1
pH	7.10 - 7.15

En un matraz de 1000 ml se agregó 1 L de agua destilada. Posteriormente, se adicionaron cada uno de los compuestos en las cantidades establecidas y se

ubicó en la plancha de calentamiento a temperatura media (225 °C) con agitación magnética hasta obtener una mezcla homogénea.

Para esterilizar el medio se usó la autoclave a una temperatura de 120 °C por 20 minutos (Morante, 2018).

3.7.1.2. REACTIVACIÓN DE BACTERIAS.

Se utilizaron bacterias aisladas pertenecientes al género *Bacillus* sp provenientes de muestras de suelos de la expedición realizada en la Antártida en el año 2014, yacen en el banco de muestras de la ESPAM MFL mantenidas en cajas de crioconservación a una temperatura de -20 °C.

Se empleó la metodología descrita por (Monroy 2019):

- Obtenidas las cepas puras, para su reactivación se trabajó en una cabina de flujo laminar, bajo condiciones aisladas para evitar la contaminación por ingreso de microorganismos exteriores.
- Se manipularon cinco matraces de 50 ml previamente esterilizados y rotulados con las cinco cepas de *Bacillus* sp. En cada matraz se procedió a añadir 12 ml de caldo nutriente, inoculando de acuerdo a su respectivo etiquetado 1000 µL de la cepa correspondiente. Se incubaron a 37 °C con agitación de 150 rpm durante 24 h a 48 h.

3.7.1.3. ACTIVIDAD 2. TINCIÓN DIFERENCIAL DE GRAM.

La tinción de Gram fue necesaria para la visualización de las muestras de cultivo Pérez et al. (2008), mediante la cual se verificó la presencia única de *Bacillus* sp y su óptimo crecimiento para posterior aplicación.

Se empleó la metodología descrita por (Peralta et al., 2021):

En una cabina de flujo laminar:

- Se colocó en cada portaobjeto rotulado 50 µL de la cepa correspondiente, haciendo uso de una pipeta automática.
- Se fijó con fuego.

En una zona de esterilización cada portaobjeto:

- Fue cubierto con cristal violeta por 1 min y luego lavado con agua destilada.
- Se aplicó lugol por 1 min y lavó con agua destilada.
- Se cubrió con acetona por 30 s y lavó con agua destilada.
- Aplicación de safranina por 1 min y lavó con agua destilada.
- Se dejó secar a temperatura ambiente.

En un microscopio óptico (Optika Italy) cada portaobjeto:

- Se observó a una resolución de 10X
- Se observó a una resolución de 40X
- Se observó a una resolución de 100X

3.7.1.4. ACTIVIDAD 4. PREPARACIÓN DE MEDIO DE SALES MINERALES

El Medio de Sales Minerales (MSM) fue utilizado como medio de conservación de los precipitados bacterianos (Puerto, 2019). La composición de este se basó en la metodología descrita por Santos (2020):

Un 1 litro de agua destilada contuvo las siguientes composiciones:

Tabla 3.2. Medio de Sales Minerales

Nombre de la sal	Compuesto	Cantidad (g/l)
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	4.000
Fosfato monopotásico	KH_2PO_4	4.700
Fosfato de disodio	Na_2HPO_4	0.119
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.100
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.000
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.010
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.015

Fuente: (Santos, 2020)

En un matraz de 1000 ml se agregó 1 L de agua destilada. Posteriormente, se adicionaron cada uno de los compuestos en las cantidades establecidas y se ubicó en la plancha de calentamiento a temperatura media (225 °C) con agitación magnética hasta obtener una mezcla homogénea. Para esterilizar el medio se hizo uso de la autoclave 120 °C por 20 minutos (Morante, 2018).

3.7.1.5. ACTIVIDAD 5. ACONDICIONAMIENTO DE *Bacillus* sp AL DIÉSEL

El desarrollo de la actividad se efectuó en una cabina de flujo laminar. Se hizo uso de cinco matraces de 150 ml previamente esterilizados y rotulados con las cinco cepas correspondientes.

Se empleó la metodología descrita por Santos (2020):

En cada matraz se procedió a depositar 90 ml del medio de sales minerales. Posterior a ello se añadieron 0,40 ml de diésel en estado puro, el cual sirvió como única fuente de carbono para cada cepa. Por último, se agregaron 9,60 ml de caldo nutriente con *Bacillus* sp. Los matraces se llevaron a una cámara de incubación con temperatura ambiente (37 °C) por un periodo de 5 días.

3.7.1.6. ACTIVIDAD 6. PREPARACIÓN DE AGAR

Se utilizó Agar Nutriente como medio de cultivo para *Bacillus* sp; su preparación se dio conforme a la información otorgada por el fabricante (Arotaype y Chambilla, 2022):

En un matraz de 1000 ml se agregó 1 L de agua destilada al cual se adicionó 28 gr del agar nutriente, regulando el pH en rangos de 7.4 - 7.6. La preparación fue ubicada en la plancha de calentamiento a temperatura media (225 °C) con agitación magnética hasta obtener una mezcla homogénea.

Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

3.7.1.7. ACTIVIDAD 7. CULTIVO Y CRECIMIENTO DE *Bacillus* sp.

Para esta actividad se utilizaron 45 cajas Petri previamente esterilizadas y rotuladas (9 por cada cepa de *Bacillus* sp).

Se empleó la metodología descrita por (Morante 2018):

Haciendo uso de la cabina de flujo laminar, se prepararon las cajas Petri añadiendo 13 ml del agar nutriente elaborado anticipadamente. Una vez solidificado el medio agar, con la pipeta automática se añadió en la superficie 500 µL de diésel en estado puro.

Cada cepa se inoculó en discos de papel filtro de 0.5 cm de diámetro, (9 por cada tratamiento), los cuales fueron ubicados en la parte central de la caja Petri con ayuda de una pinza. Las cajas se mantuvieron en incubación bajo condiciones de 37 °C por tiempos de 24, 48 y 72 horas (Delgadillo et al., 2018).

3.7.2. FASE 2. DETERMINAR EL POTENCIAL DE BIODEGRADACIÓN DE *Bacillus* sp CON RELACIÓN AL TIEMPO DE RESPUESTA.

3.7.2.1. ACTIVIDAD 8. EVALUACIÓN AL HALO EN DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE LAS CEPAS BACTERIANAS POR 24, 48 Y 72 HORAS.

Una vez transcurrido el primer período de incubación (24 horas) se procedió a evaluar 3 repeticiones por cada uno de los tratamientos. Las cajas Petri fueron ubicadas en una superficie desinfectada, con adecuada iluminación para facilitar la observación directa y proliferación de las cepas bacterianas (Contreras, 2019).

Luego, con ayuda de una regla milimetrada, se procedió a medir el diámetro del halo de hidrólisis formado alrededor del disco inoculado, además del diámetro de colonia, resultado de la actividad enzimática microbiana (Gómez et al., 2015). Con los datos recopilados, se aplicó la ecuación 3.1 para estimar el área del halo de degradación, siguiendo las indicaciones sugeridas.

El proceso se repitió una vez transcurrido cada uno de los periodos de tiempo establecidos (48 y 72 horas), evaluando 3 repeticiones por cada tratamiento.

3.7.2.2. ACTIVIDAD 9. ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN

Para el cálculo del porcentaje de degradación de hidrocarburos se consideraron los datos obtenidos a partir de la determinación proporcional entre el área del halo de degradación y el área de la caja de Petri (Aranzales, 2017), aplicando las ecuaciones 2.1, 3.1 y 3.2, respectivamente.

3.8. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se empleó un modelo de Diseño De Bloques Completamente Al Azar (DBCA) unifactorial y tres bloques donde el único factor de estudio fue la variación de las cepas con respecto al tiempo. El estudio se conformó por cinco tratamientos (cepas) con tres repeticiones en cada uno de los tiempos establecidos (24, 48 y 72 horas), obteniendo un total de cuarenta y cinco unidades experimentales, para el caso del control no se añadieron las bacterias, finalmente se llevaron a incubación a temperatura ambiente controlando, la cantidad de diésel como la composición de las cepas se mantuvieron constantes (Morante, 2018).

Tabla 3.8 Tratamientos (cepas) con respecto al tiempo de estudio

Tratamientos (Cepas)	Tiempo (Horas)		
T1 (GA52)	24	48	72
T2 (T29)	24	48	72
T3 (T21)	24	48	72
T4 (T13)	24	48	72
T5 (DEE71)	24	48	72

Fuente: Las autoras

El análisis de la varianza correspondiente al diseño de bloques completamente al Azar (DBCA) se detalla a continuación:

Tabla 3.8. Fuente de variación del análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de Libertad	Fórmula
Tratamientos	4	$GL_{Trat.} = t - 1$
Bloques	2	$GL_{Bloq.} = b - 1$
Error Experimental	8	$GL_E = (t - 1)(b - 1)$
Total	14	$GL_{Tot.} = bt - 1$

Fuente: Las autoras.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar las diferencias entre los tratamientos, se ejecutó un Análisis de Varianza (ANOVA) y prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5% (95% de confianza) ajustado al modelo DBCA con arreglo unifactorial y tres bloques en el programa InfoStat, de esta manera se evaluaron los efectos de la variación de la cepa con respecto a los diferentes periodos de estudio.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. FASE I. REACTIVACIÓN DE BACTERIAS *Bacillus* sp. COMO MEDIO BIODEGRADADOR DE DIÉSEL

4.1.1. REACTIVACIÓN DE BACTERIAS

Transcurridas las 48 horas de incubación de cada una de las cepas bacterianas, se visualizó turbidez general en todo el caldo (Anexo 1), lo que de acuerdo a Kaiser (2021) es un indicativo de crecimiento bacteriano. Posteriormente se realizó la observación de las bacterias con ayuda del microscopio óptico:

A nivel microscópico se realizó la tinción diferencial de Gram (Anexo 2), logrando indicar la presencia de bacilos Gram negativos en las cinco cepas estudiadas de *Bacillus* sp; Erkmen (2021) establece que la tinción es necesaria para poder identificar a que clase bacteriana corresponden las bacterias, si Gram positivas o Gram negativas.

A nivel macroscópico se evidenció la formación de colonias con forma bacilar y borde ovaladas con endospora central y con forma elipsoidal, que a criterio de Patiño (2020) son características pertenecientes al género *Bacillus* sp ya que estas pueden ser de aspecto mucoso, bordes rugosos u ondulados, forma bacilar y en el interior de estas presenta una endospora casi esférica en la parte central de forma elipsoidal (Grande, 2019).

Se obtuvo un total de 10.5 ml de muestra de cada uno de los medios.

4.1.2. ACONDICIONAMIENTO DE *Bacillus* sp AL DIÉSEL

A medida que transcurrieron los días de adaptación de cada una de las cinco cepas de *Bacillus* sp se percibieron cambios en el medio de cultivo, conformado por medio de sales minerales, diésel y consecutivamente las bacterias (Santos, 2020). Para Erkmen (2021) los medios de cultivo aportan nutrientes necesarios que ayudan al crecimiento del microorganismo y a su vez Maier et al. (2009) señala que ésta persiste como su única fuente de carbono, haciendo que la bacteria comience a utilizar dichos componentes para alimentarse aumentando así su tamaño celular.

En los primeros tres días de acondicionamiento se divisó un leve incremento en la turbidez del medio del cultivo de cada matraz, Rolfe et al. (2012); Azhdarpoor et al. (2019) indican que en la fase de crecimiento las bacterias alcanzan un determinado tamaño que las hace notar a simple vista, esto se debe a que las bacterias crecen produciendo turbidez, ocasionando un cambio evidente en el medio. Cumplido los cinco días de incubación (periodo de adaptación) la turbidez del medio incrementó satisfactoriamente, demostrando así un avance en el crecimiento bacteriano. El grado de turbidez en el medio de cultivo está directamente relacionado con el número de microorganismos presentes (Bonnet et al., 2020). Consecutivamente se realizó un frotis para evidenciar la presencia única de *Bacillus* sp y su morfología para constatar que estas se hayan adaptado al medio de cultivo.

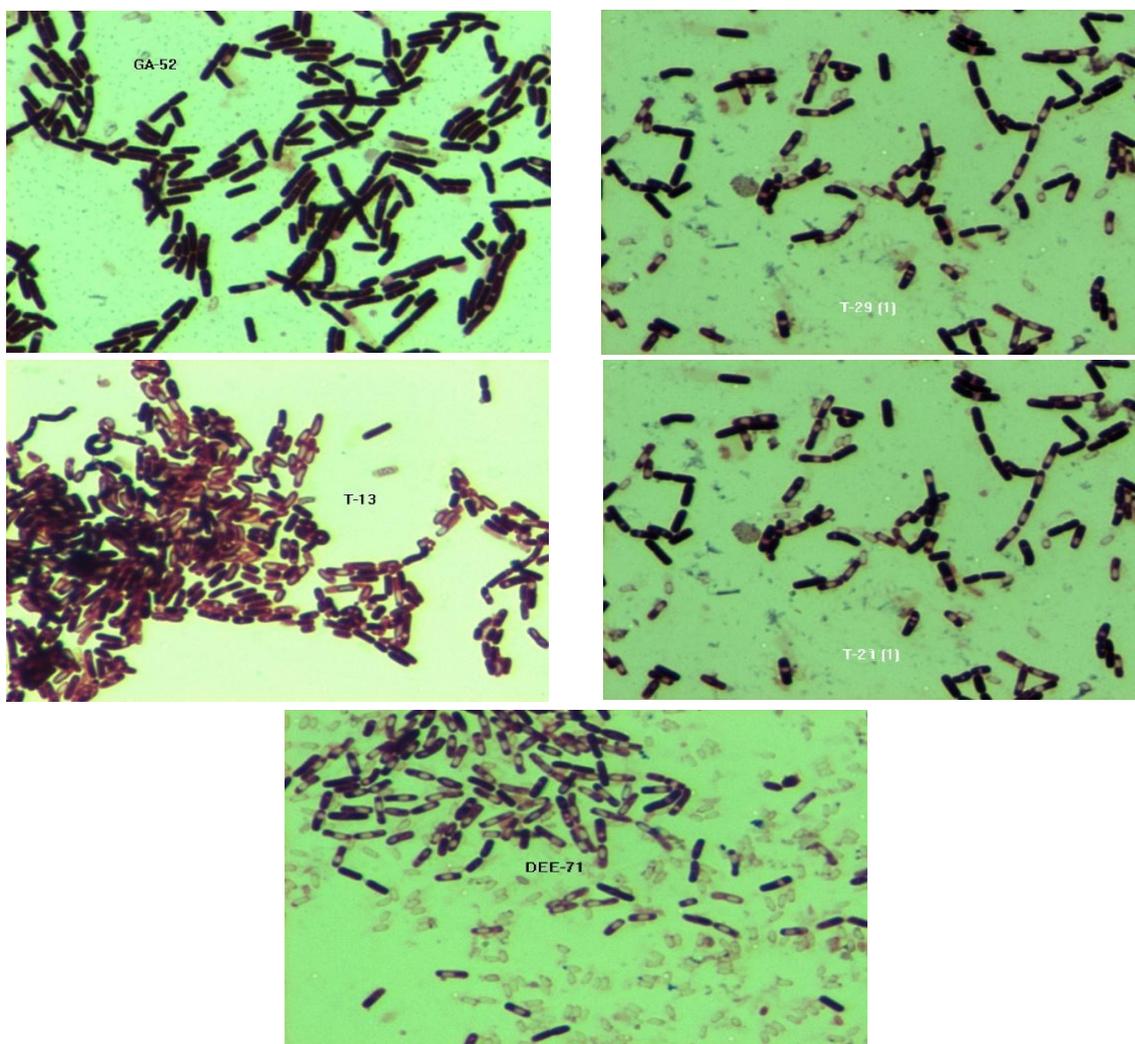


Figura 4.1. Morfología de *Bacillus* sp de las cepas GA-52, T-29, T-13, T-21, DEE-71

4.1.3. CULTIVO Y CRECIMIENTO DE *Bacillus* sp

Para el cultivo y crecimiento de *Bacillus* sp se hizo uso del agar nutriente, Grutsch et al. (2018) estipula que las bacterias del género *Bacillus* sp muestran una amplia gama de características que les permiten crecer en algunos medios de cultivo como agar nutritivo o medios de peptona según corresponda en ambientes controlados. Conforme a Ahmad et al. (2023) los componentes del agar permiten la formación de colonias, coincidiendo con Bonnet et al. (2020) quienes mencionan que el crecimiento bacteriano realizado en este medio nos ratifica la capacidad que tienen las bacterias para expandirse alrededor de la caja Petri, no obstante, el hidrocarburo proporcionado es utilizado como fuente de energía y carbono por las bacterias (Das y Chandran, 2011). Hay que señalar que la adaptación de los *Bacillus* sp depende de su especie, ya que algunas de las esporas producidas por este género son resistentes al calor, frío radiación ionizante, deshidratación y otras condiciones (Erkmen, 2022).

4.2. FASE II. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE BIODEGRADACIÓN DE *Bacillus* sp CON RELACIÓN AL TIEMPO DE RESPUESTA

4.2.1. EVALUACIÓN AL HALO EN DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE LAS CEPAS BACTERIANAS POR 24, 48 Y 72 HORAS

La evaluación del halo de degradación se efectuó relacionando el diámetro de crecimiento (halo bacteriano) con el diámetro de colonia desarrollado por cada una de las cepas de *Bacillus* sp, cultivadas en medio agar con diésel en estado puro bajo condiciones controladas y posteriormente evaluadas luego de 24, 48 y 72 horas.

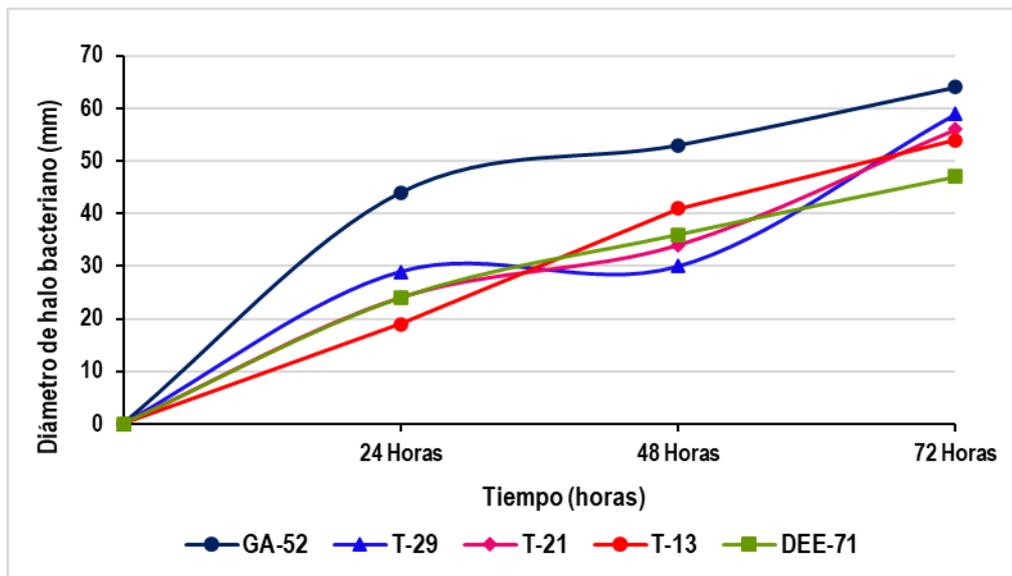


Figura 4.2. Media de crecimiento del halo bacteriano (mm) con respecto al tiempo (h)

La figura 4.2 (Anexo 4) demuestra el crecimiento gradual del halo bacteriano formado alrededor de los discos inoculados con cada una de las cepas de *Bacillus* sp, las cuales se incorporaron en medio agar suplementado con diésel, en el que fueron cultivadas durante 72 horas, período máximo que duró el experimento.

Con base al tiempo, se obtuvieron curvas de crecimiento exponencial y cercanas a la fase estacionaria luego de 72 horas (Rojas y Rengifo, 2021); próxima cuando los niveles de crecimiento se muestran en descenso, o en su efecto, por debajo de los registrados inicialmente, como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de compuestos tóxicos en su metabolismo (Martínez, 2018).

El modelo de la curva de crecimiento con periodos de menor actividad se justifica por la capacidad que tienen los microorganismos extremófilos, sobre todo algunos *Bacillus* de generar la formación de endosporas, que son estructuras resistentes capaces de proteger el material genético y ribosómico de las cepas bacterianas cuando existe escasez de nutrientes, lo que les permite mantenerse por un largo período de tiempo en ausencia de ellos, ocupando una mínima cantidad de su reserva para cumplir con sus funciones principales (Pedraza et al., 2020).

Sin embargo, la cinética de crecimiento no muestra datos correspondientes a la fase de latencia inicial, debido a que las cepas empleadas previamente fueron adaptadas en medio de sales minerales con diésel por un período de 5 días; la misma particularidad es mencionada por Toledo et al. (2022), donde no se evidenció fase de adaptación a causa de las características enzimáticas propias de cada cepa, lo cual permitió una rápida adaptación al medio y su desarrollo en presencia de hidrocarburos.

Para la toma de datos, se utilizó una regla graduada con plantillas de circunferencias en milímetros, que sirvió como medio práctico y efectivo para el levantamiento de información (Anexo 11). En el primer período se reportaron diámetros de crecimiento con valores mínimos para las cepas T-13 (19 mm), T-21 (24 mm), DEE-71 (24 mm) y valores máximos en las cepas T-29 (29 mm) y GA-52 (44 mm), demostrando un incremento efectivo poblacional en el transcurso de las primeras 24 horas, con respecto al diámetro inicial inoculado (0,5 mm). Los resultados tienen similitud con el estudio de Santos (2020) que obtuvo halos de desplazamiento en diésel máximo (46.80 mm) y menor (12.43 mm).

Durante la primera fase experimental (24 horas), se evidenció por observación directa el crecimiento del halo bacteriano alrededor del disco en los cinco tratamientos, esta característica de acuerdo con Abasolo y Morante (2019), determina la tolerancia de las diferentes cepas al hidrocarburo, y el consumo de éste como fuente de carbono (Vásquez, 2021). El tiempo mínimo requerido por las bacterias para la utilización del hidrocarburo fue de 24 horas (Vega y Ugaz, 2016); coincidiendo con Díaz et al. (2013), quienes determinaron por medio de patrones de crecimiento el alcance de la fase de crecimiento exponencial 24 horas después, como respuesta positiva ante la exposición de diésel.

Luego de transcurridas 48 horas, los 5 tratamientos mostraron un mayor desarrollo del halo bacteriano, reportándose valores donde los diámetros menores fueron para las cepas T-29 (30 mm), T-21 (34 mm), DEE-71 (36 mm), mientras que, los mayores corresponden a los tratamientos de T-13 con diámetro de (41 mm) y GA-52 (53 mm). La curva de crecimiento presentada por Hermoza et al. (2019) guarda relación con la del presente estudio, por mostrar un

incremento progresivo en 48 horas, ya que, al tratarse de cultivos puros, se ven favorecidos por tener mayor disponibilidad del sustrato (diésel), sin que exista mayor competitividad por el mismo.

Finalmente, en el último período experimental (72 horas), los 5 tratamientos mostraron la continuidad de crecimiento de *Bacillus* sp, tomando como indicador la variación en la amplitud del diámetro de halo bacteriano, lo cual indicó una mayor expansión poblacional de cada una de las cepas en estudio (Martínez, 2013), que además se relaciona con lo expuesto por Cuvi y Bejarano (2015), quienes indican que la extensión de bacterias desde el centro de la caja hasta los bordes son un indicador favorable al proceso y de tolerancia al sustrato.

Durante los 3 períodos de tiempo estudiados, la cepa GA-52 destacó en cuanto a crecimiento bacteriano, con diámetro de 64 mm en 72 horas con respecto a los otros tratamientos en los que se reflejó datos donde T-29 (59 mm), T-21 (56 mm) T-13 (54 mm), DEE-71 (47 mm) correspondientemente, por tanto, los resultados del estudio de Forhad et al. (2022) respaldan los de la presente experimentación, donde a mayor tiempo, incrementa el desplazamiento del halo como resultado de la multiplicación de microorganismos, considerando que los aislados bacterianos absorben diésel como única fuente de carbono para su estabilidad y replicación, logrando su transformación en compuestos más simples.

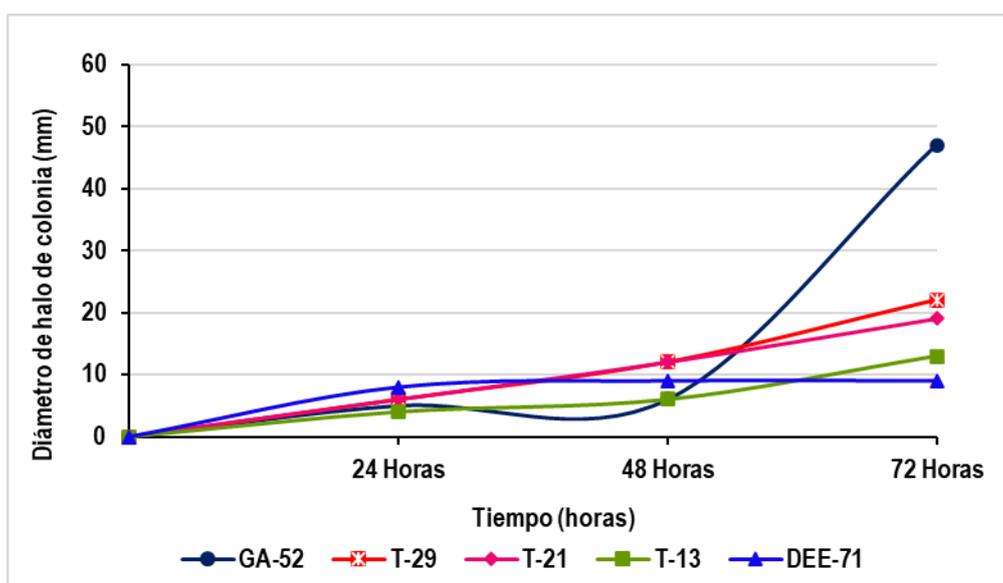


Figura 4.3. Media de crecimiento del halo de colonias por cepa en diferentes períodos

En la figura 4.3 se representa una media de la capacidad formadora de colonias de cada una de las cepas de *Bacillus* sp con respecto al tiempo. Los diámetros de crecimiento de colonias en el diésel fueron tomados en cada uno de los tres períodos de estudio con ayuda de una regla graduada.

En las 24 primeras horas se registró formación de colonias por cada uno de los tratamientos con diámetros similares, registrando un valor de 8 mm para la cepa con mayor amplitud del halo colonial DEE-71; sin embargo, una característica favorable fue la numerosa formación de pequeñas colonias de *Bacillus* sp en la zona de crecimiento enriquecida con diésel en estado puro, que incrementaron su tamaño en 48 horas mostrando halos de hasta 12 mm para las cepas T-21 y T-29, el resto de tratamientos presentaron diferencias poco significativas entre estos dos períodos.

Cevallos y Niño (2014) fundamentan que cada cepa viable origina la formación de colonias que requieren como mínimo 24 horas para que sean visibles de forma macroscópica y puedan distinguirse entre unidades formadoras de colonias (UFC), utilizadas para el conteo en placa y distinción de tolerancia al sustrato, coincidiendo con Salinas (2019), quien reportó diámetros de halo en bacterias y hongos cercanos a 1 mm en 24 horas.

Los *Bacillus* sp, extremófilos, en condiciones favorables, proliferan formando colonias con halos de hidrólisis, su desarrollo depende de factores como la temperatura, el tipo de sustrato suministrado como fuente de carbono y el tiempo de exposición (Castillo et al., 2020).

Con respecto a los valores de los tiempos evaluados, se demostró una mayor efectividad de crecimiento de colonias para los tratamientos de 72 horas, lo que indica un proceso de adaptación más extenso, en comparación con las otras etapas. El mejor incremento a la formación de un halo colonial correspondió a la cepa GA-52, con un rango de crecimiento que alcanzó 47 mm de diámetro, mientras que, los otros tratamientos visualizaron valores más bajos T-29 (22 mm), seguido de las cepas T-21 (19 mm), T-13 (13 mm) y DEE-71 (9 mm).

El tiempo de experimentación coincide con los desarrollados por Collaguazo y Tenorio (2018); Gómez et al. (2017), donde el crecimiento exponencial de la bacteria se observó entre las 24 y 72 horas de cultivo, siendo este último en el

que se alcanzó el máximo desplazamiento de halos coloniales. De igual forma, Lama (2017) afirma la formación de halos después de 72 horas de incubación, sosteniendo que, a mayor tiempo de incubación, incrementa el diámetro de halo que rodea a la colonia.

La cinética de crecimiento en la figura 4.3 es justificada por el ambiente de estrés bajo el cual fueron sometidas las cepas de *Bacillus*, ya que, al reducir la disponibilidad de nutrientes en su entorno de cultivo, estas tienen la necesidad de consumir el hidrocarburo disponible como única fuente de carbono, lo cual explica los picos de crecimiento para el tercer período de estudio (Corrales et al., 2017).

4.2.2. ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN

La biodegradación del hidrocarburo de petróleo (diésel) se determinó mediante la relación entre el área estimada del halo de degradación desarrollado por cada cepa y el área de la caja de Petri utilizada como medio de crecimiento para los cultivos.

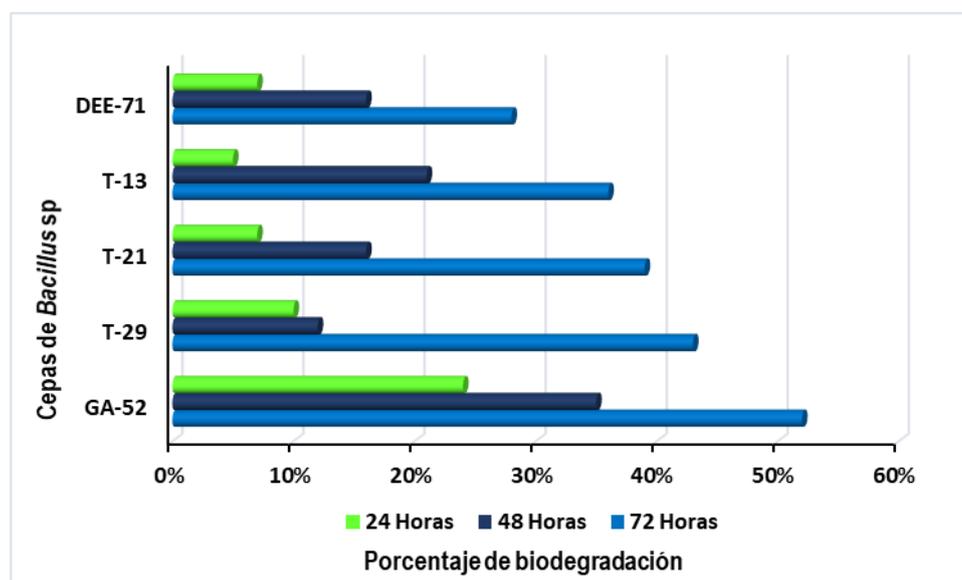


Gráfico 4.4. Porcentaje de biodegradación de diésel por cada cepa con respecto al tiempo

La figura 4.4 (Anexo 5) precisa el potencial de biodegradación de diésel efectuado por las cinco cepas bacterianas con relación al tiempo de estudio (24, 48 y 72 horas), las cuales fueron sometidas a experimentación bajo condiciones

controladas para determinar su capacidad degradadora y la efectividad de aplicación.

De las cepas de *Bacillus* sp utilizadas para el estudio, se determinó en la primera etapa (24 horas), una respuesta favorable en cada uno de los tratamientos. La cepa con mayor adaptabilidad al hidrocarburo resultó ser la GA-52 registrando un valor de 24% de degradación de diésel para este primer periodo; mientras que los tratamientos con otras cepas mostraron porcentajes más bajos T-29 (10%), T-21 (7%), T-13 (5%), DEE-71 (7%), respectivamente.

Se afirma que las bacterias aisladas procedentes de medios contaminados con hidrocarburos (diésel) presentan mayor capacidad para degradar este tipo de compuestos, lo cual sustenta la presente investigación, ya que se someten a un ambiente bajo estrés, que obliga a los microorganismos tolerantes a desarrollar respuestas enzimáticas y fisiológicas concretas para su degradación (Martínez et al., 2015; Alarcón et al., 2022).

Un indicador determinante es el desplazamiento que mostraron los *Bacillus* sp sobre la caja de Petri, el mismo que coincide con el estudio de Pérez et al. (2020) quienes mencionan que este tipo de expansión produce una reducción de la densidad del hidrocarburo añadido en la superficie, lo cual indica la capacidad de las cepas para degradar el compuesto y el consumo del carbono de éste como fuente de energía para su crecimiento.

Los resultados estimados para el período de 48 horas indican el avance del proceso de degradación del diésel como fuente de carbono, definiendo un incremento progresivo para las cinco cepas, donde se alcanzaron porcentajes de biodegradación con GA-52 (35%), seguido de T-13 (21%), T-21 (16%), DEE-71 (16%) y la cepa T-19 (12%).

En la última fase experimental (72 horas), se evidenciaron valores que superaron los de los tiempos (24 y 48 horas). La cepa con mayor potencial de biodegradación entre los 5 tratamientos fué GA-52 que destacó con un valor de 52%, seguido por las cepas T-29 (43%), T-21 (39%), T-13 (36%) y DEE-71 (28%). Los porcentajes estimados comprobaron el aumento gradual de capacidad degradadora efectuada por cada cepa bacteriana entre períodos, y

demonstró que, a mayor tiempo, el proceso de biodegradación incrementa, indicando así la efectividad del proceso.

Los valores reportados se ajustan a los de Morales (2017), quien registró valores que superaron el 50% de biodegradación de diésel utilizando cepas bacterianas aisladas y 79% empleando un consorcio. El mismo autor menciona que el potencial degradativo de este tipo de compuesto se incrementa cuando se trata de cultivos mixtos, aunque en estos casos, ambos reflejaron alta capacidad degradadora, lo cual se debe a la capacidad de algunos grupos de *Bacillus* sp de producir biosurfactantes y degradar diferentes hidrocarburos, coincidiendo con Chávez et al. (2016) quienes establecen reportes de este tipo de bacterias capaces sintetizar biosurfactantes a partir de fuentes de carbono como derivados de petróleo.

Para que la aplicación de un microorganismo en biodegradación sea factible, este debe tener una eficiencia de degradación del sustrato de 30-40% en un tiempo limitado (4 a 6 semanas) (Araujo, 2016); lo cual afirmó la viabilidad del empleo de cepas bacterianas aisladas en su estudio con resultados de remoción de 71,2% y 65,78%, suministrando diésel como única fuente de carbono y la factibilidad de aplicación de las cepas evaluadas mediante el presente estudio, cuyo porcentaje máximo de degradación se estimó para la cepa GA-52 en 72 horas (52%).

Como información adicional, Álava y Velásquez (2023) realizaron una evaluación de *Bacillus* sp. antárticos en la degradación de polietileno PET, los resultados obtenidos a los 45 días demostraron una degradación de este compuesto, donde T-29 (1,3103%) presentó mayor potencial de biodegradabilidad, siguiendo la cepa DEE-71 (1,0415%), T-21 (0,8833%), GA-52 (0,7438%) y T-13 (0,1951%).

4.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE BIODEGRADABILIDAD

Los resultados de biodegradación fueron sujetos al análisis estadístico de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey en el software estadístico InfoStat.

Tabla 4.1. Resumen del análisis de varianza (ANOVA).

	Variable	N	R²	Aj	CV
	% biodegradación	15	0,95	0,91	18,52
Factores	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F calculada	p-valor
Modelo	0,29	6	0,05	25,56	0,0001
Bloque	0,21	4	0,11	57,49	<0,0001
Tratamiento	0,07	2	0,02	9,59	0,0038
Error	0,01	8	1,9E-03		
Total	0,30	14			

En la tabla 4.1 se observa que el modelo explica una porción significativa de la variabilidad de la variable (% biodegradación), ya que el p-valor asociado es menor a 0,05. Además, tanto los tratamientos como los bloques también explican una porción significativa de la variabilidad, ya que sus p-valores son menores a 0,05. Por otro lado, el error es pequeño en comparación con las demás fuentes de variación. Los tratamientos (cepas) y los bloques son significativos para explicar la variabilidad de la variable % biodegradación.

La tabla resumen del análisis de varianza (ANOVA) muestra que el modelo en su conjunto es significativo, con un valor de F de 25,56 y un p-valor de 0,0001, lo que considera que al menos uno de los factores (tratamiento o bloque) está influyendo en la biodegradación del diésel. Además, la proporción de la variación total explicada por el modelo es alta, con un R² de 0,95 y un Aj ajustado de 0,91, lo que sugiere que el modelo es capaz de explicar la mayoría de la variación observada en los datos.

En cuanto a los factores individuales, la tabla ANOVA muestra que tanto los tratamientos como el bloque son significativos (p-valor de <0,0001 y 0,0038, respectivamente), demostrando así que hay diferencias significativas entre las cepas en términos de su capacidad de biodegradación, así como diferencias significativas entre los tres bloques de tiempo. Por lo tanto, al existir diferencia estadística, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, ya que (p-valor <0,05).

La prueba de Tukey se utiliza para comparar todas las posibles combinaciones de medias de grupos en un análisis de varianza (ANOVA) y determinar si hay diferencias significativas entre ellas. Los resultados que se han proporcionado indican que se ha realizado una prueba de Tukey con un nivel de significancia (alfa) de 0,05 y un valor de distancia mínima significativa (DNS) de 0,12192 con un error de 0,0019.

Tabla 4.2.2. Test: Tukey Alfa= 0,05 DNS=0,12192- Error: 0,0019 gl: 8

Tratamiento (cepas)	Medias	n	E.E	
DEE-71	0,17	3	0,02	A
T-13	0,21	3	0,02	A
T-21	0,21	3	0,02	A
T-29	0,22	3	0,02	A
GA-52	0,37	3	0,02	B

En la tabla 4.2 se muestran las medias, el tamaño de la muestra y el error estándar de las medias para cada tratamiento (cepas). Además, se muestran las letras A y B junto a las medias, lo que propone que hay diferencias significativas entre las medias de los tratamientos. Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes, mientras que aquellos con letras diferentes sí lo son.

La prueba de Tukey indica que las medias de biodegradación en 24, 48 y 72 horas se pueden agrupar en dos grupos: uno que incluye los tratamientos DEE-71, T-13, T-21 y T-29 (A), y otro que incluye solo el tratamiento GA-52 (B). Por lo que se demuestra que el tratamiento GA-52 tiene una capacidad significativamente mayor de biodegradar el diésel en comparación con las otras cepas, al menos bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio.

Estos resultados sugieren que hay diferencias significativas en la capacidad de biodegradación de las cepas utilizadas en este experimento, y que el tratamiento GA-52 puede ser especialmente efectivo en la biodegradación del diésel. Sin embargo, es importante tener en cuenta las limitaciones del estudio y la necesidad de replicar los resultados en condiciones experimentales similares o diferentes.

Algunos estudios previos han demostrado que existen diferencias significativas en la capacidad de biodegradación de diferentes cepas de bacterias. Por ejemplo, un estudio realizado por Mohseni-Bandpi et al. (2010) encontró que una cepa tenía una capacidad significativamente mayor de biodegradar hidrocarburos de petróleo que otras cepas. Otro estudio realizado por Kafilzadeh et al. (2016) esclareció que diferentes cepas de bacterias tenían diferentes tasas de biodegradación de petróleo crudo.

En general, los resultados de este estudio son consistentes con la literatura previa y sugieren que es importante considerar tanto las diferencias entre las cepas como los bloques de tiempo al analizar la biodegradación del diésel. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los resultados pueden variar dependiendo de las condiciones experimentales y las cepas utilizadas, y se necesitan más estudios para comprender completamente la biodegradación del diésel en diferentes contextos.

Tabla 4.3. Test: Tukey Alfa= 0,05 DNS=0, 07811- Error: 0,0019 gl: 8

Tiempo de medición	Medias	n	E.E	
24 horas	0,11	5	0,02	A
48 horas	0,20	5	0,02	B
72 horas	0,39	5	0,02	C

La tabla 4.3 determina las medias, el tamaño de la muestra y el error estándar de las medias para cada tratamiento (cepas) en cada tiempo de medición (24 horas, 48 horas y 72 horas). Se evidencian las letras A, B y C junto a las medias, lo que establece que hay diferencias significativas entre las medias de cada tratamiento.

El análisis de los resultados sugiere que existe una variación significativa en la tasa de biodegradación del diésel entre las diferentes cepas. Esta variación puede ser atribuida a factores como la capacidad metabólica de las cepas, la concentración de nutrientes, la temperatura y otros factores ambientales.

En un estudio previo realizado por Li et al. (2019), se evaluó la capacidad de biodegradación de diferentes cepas de bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo. Los resultados mostraron que algunas cepas tenían

una tasa de biodegradación significativamente mayor que otras, lo que sugiere que la selección de cepas específicas puede mejorar la tasa de biodegradación del petróleo. Estos hallazgos son consistentes con los resultados del presente estudio, que sugieren que la cepa GA-52 tiene una capacidad de biodegradación significativamente mayor que las otras cepas evaluadas.

En cuanto a la importancia de considerar los bloques de tiempo en el análisis de la biodegradación del diésel, varios estudios también han demostrado que la biodegradación puede variar significativamente a lo largo del tiempo. Das et al. (2013) evidenció que la biodegradación aumentó significativamente después de 30 días de incubación. En cambio, Wang et al. (2016) evidenció que la biodegradación fue más rápida durante los primeros 7 días de incubación, pero luego disminuyó en las siguientes semanas.

Por otro lado, el hecho de que haya diferencias significativas en las medias de los tratamientos en cada tiempo de medición podría deberse a la limitación de las condiciones experimentales utilizadas. Esto tiene concordancia con los hallazgos de un estudio realizado por Fu et al. (2019), en el que se encontró que la tasa de biodegradación del petróleo puede verse afectada por una variedad de factores ambientales, como la concentración de nutrientes, la temperatura y la presencia de otras sustancias contaminantes.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Las cepas aisladas de *Bacillus* sp procedentes de una expedición realizada en la Antártida en el año 2014, fueron reactivadas en caldo nutriente bajo condiciones controladas, demostrando su óptimo crecimiento y respuesta favorable al medio de adaptación compuesto por sales minerales y diésel comercial como única fuente de carbono, mediante la presencia de cepas puras verificadas con tinción de Gram. En las curvas representativas de la cinética de crecimiento, se observaron perfiles similares para cada tratamiento; los reportes de datos no registraron fase de latencia, sin embargo, se precisó la proximidad a la fase estacionaria luego de 72 horas.
- De los 3 períodos evaluados se determinó que el mejor tiempo de respuesta fue a las 72 horas, destacando con mayor potencial de biodegradación las cepas GA-52 (52%), T-29 (43%) y T-21 (39%), las cuales evidenciaron una mayor amplitud del halo bacteriano y disminuyeron la densidad del hidrocarburo presente en cada uno de los tratamientos, demostrando la eficiencia de las cepas aisladas para reducir la concentración de compuestos derivados del petróleo. Los resultados demuestran la capacidad degradadora de las cinco cepas bacterianas sobre el hidrocarburo, por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa de que algunas de las cepas de *Bacillus* sp aisladas de la Antártica demuestran la capacidad de degradar diésel hasta en un 30%.

5.2. RECOMENDACIONES

- Desarrollar trabajos de degradación de diésel utilizando consorcios microbianos procedentes de muestras de suelo con antecedentes de contaminación por compuestos hidrocarburoados, con la finalidad de establecer comparaciones entre el potencial de degradación de cultivos puros y mixtos.

- Realizar el registro de datos en intervalos cortos durante el proceso de biodegradación, que permita establecer una cinética de crecimiento precisa y prolongar tiempos hasta el alcance de la fase estacionaria.
- Aplicar métodos de evaluación distintos, considerando pruebas enzimáticas, y la cuantificación de la cantidad inicial de hidrocarburo y su variación a lo largo del tiempo, empleando diferentes concentraciones de sustrato (diésel).
- Utilizar un tratamiento control en el manejo experimental, a fin de establecer comparaciones entre los tratamientos que contengan sustrato (diésel) como fuente de carbono y otros cuya fuente sea diferente.
- Dar continuidad al presente estudio, aplicando las cepas aisladas con mayor potencial de biodegradación en entornos contaminados con hidrocarburos, a fin de conocer su potencial bajo parámetros ambientales no controlados.

BIBLIOGRAFÍA

- Abasolo, F., y Morante, L. (2019). Bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con hidrocarburos. *Universidad Técnica Estatal de Quevedo*, 43-50.
- Acevedo, R. (2021). Extremophilic microorganisms of Antarctica an ecosystem analogous to Mars. UTB.
- Acurio, D., Mamarandi, E., Ojeda, A., Tenorio, M., Chiluisa, P., y Vaca, Á. (2021). valuación de *Bacillus* spp. como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) en brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) y lechuga (*Lactuca sativa*). *Revista de Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 2-19.
- Ahmad, J., Mansoor, S., Choh, R., y Un Nissa, N. (2023). *Basic Life Science Methods. A Laboratory Manual for Students and Researchers*: Academic Press.
- Alava, S., y Velásquez, C. (2023). Evaluación de *Bacillus* sp. Antárticos en la biodegradación de polietileno PET. Calceta: ESPAM MFL.
- Alsanius, B., y Wohanka, W. (2019). *Root Zone Microbiology of Soilless Cropping Systems*. Soilless Culture.
- Alarcón, J., Gaviria, J., Sandoval, É., Gómez, F., Zopó, R., García, M., . . . Garcés, S. (2022). Biodegradación de petróleo crudo a partir de bacterias aisladas de un suelo contaminado con crudo. *Sentidos y perspectivas de la investigación formativa en tiempos de pandemia*, 95-114.
- Andrade, H., Arteaga, C., y Segura, M. (2017). Emisión de gases de efecto invernadero por uso de combustibles fósiles en Ibagué. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(1), 103-112.
- Aranzales, U. (2017). *Evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburos de una colección de hongos de la Universidad de los Andes*. Obtenido de <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/53991/25048.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

- Araujo, I. (2016). Biorremediación de aguas contaminadas con derivados de hidrocarburos utilizando cepas bacterianas autóctonas. *University of Zulia - Biologicals System and wastewater purification*.
- Arenas, J., y Rivera, N. (2020). *Universidad de La Salle*. Obtenido de Evaluación de la capacidad de biodegradación de diésel por células libres e inmovilizadas de *Chromobacterium violaceum*: https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=2874&context=ing_ambiental_sanitaria.
- Arotaype, M., y Chambilla, C. (2022). *Actividad Antibacteriana del Extracto Glicólico de las Hojas de Synadenium grantii Hook (Árbol de la vida), sobre cepas de Escherichia coli ATCC 8739 in vitro*. Universidad María Auxiliadora.
- Ayala, K. (2020). *Biotransformación de polímeros sintéticos por medio de bacterias*. Bogotá: Universidad Nacional Abierta y a Distancia- UNAD.
- Azhdarpoor, A., Salehi, N., Heidari, H., Sarmadipour, M., y Mahmoudian, H. (2019). Relationship between Turbidity and Microbial Load of Water in Salman Farsi Dam Reservoir. *Journal of Environmental Pollution and Management*.
- Bonnet, M., Lagier, J., Raoult, D., y Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*.
- Brambila, J., Rojas, M., y Pérez, V. (2019). *Evaluación financiera de los proyectos de biorrefinerías con la metodología de opciones reales*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Brutti, L., Beltrán, M., y García, I. (2018). *Biorremediación de los Recursos Naturales*. HURLINGHAM, BUENOS AIRES: INTA.
- Castillo, R., More, F., Cornejo, M., Fernández, J., y Matonnier, M. (2020). Aislamiento de bacterias con potencial biorremediador y análisis de comunidades bacterianas de zona impactada por derrame de petróleo en

- Condorcanqui – Amazonas – Perú. *Revista de Investigación Altoandina*, 215-225.
- Cabana, J. (2020). Evaluación de los posibles impactos ambientales generado por el método de explotación de hidrocarburos no convencionales en los acuíferos. 13-22.
- Castillo, D., Ninaja, F., y Castellanos, R. (2020). Crecimiento de colonia y halo de hidrólisis celulolítico de las bacterias termófilas GCB-13 y GCC-13 a diferentes temperaturas. *Universidad Nacional Jorge Basadre Grohman - Fondo editorial universitario*, 45-50.
- Cavazos, J., Pérez, B., y Mauricio, A. (2017). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo Puebla, México. *Revista Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 539-550.
- Cevallos, D., y Niño, H. (2014). Identificación de bacterias biorremediadoras presentes en ripios de perforación en base aceite y evaluación de su eficiencia degradativa de hidrocarburos ex-situ. *Universidad Central del Ecuador*.
- Chávez, J., Rodríguez, M., Romero, Y., Ayala, A., Ruvalcaba, J., y Toribio, J. (2016). *Pantoea agglomerans* productora de biosurfactante aislada de rizosfera de pastos Tanzania y Llanero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 961-968.
- Carvajal, D. (2020). Evaluación de los procedimientos de biorremediación para el tratamiento de fluidos aceitosos. UNAD.
- Collaguazo, L., y Tenorio, E. (2018). Elaboración de biopreparados a base de *Bacillus* sp. para controlar *Altenaria* spp. en el cultivo de *Brassica oleracea* var *italica*. *Universidad Politécnica Salesiana*.
- Corrales, C. (2017). *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca*, 45-65.

- Corrales, L., Caycedo, L., Gómez, M., Ramos, S., y Rodríguez, J. (2017). Bacillus y crecimiento vegetal . *Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca*, 45-65.
- Constitución de la República del Ecuador. (2008). *Constitución de la República del Ecuador*.
- Constanza, M., Durán, R., Hernández, L., Rodríguez, L., Barra, B., Dorochesi, F., y Seeger, M. (2019). *Bioremediation of Petroleum*. Elsevier.
- Contreras, F. (2019). Empresa Social del Estado Hospital de la Vega. 1-14.
- Cornejo, R. (2019). Energía, economía y medio ambiente: una mirada desde la sostenibilidad y el humanismo. Universidad de Navarra, Pamplona.
- Chenaut, V. (2018). Impactos sociales y ambientales de la explotación de hidrocarburos en el municipio de Papantla, Veracruz (México). *Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social (CIESAS)*, 30-49.
- Cherry, R. (2018). *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*. 37-53.
- Chuquer, D., Ampudia, S., Puertas, C., Bustamante, L., Reina, C., y Ramírez, F. (2018). Contaminación del aire a filo de calle en Quito, caso de estudio Guayaquil y Espejo. *Revista Científica Perfiles*, 90-99.
- Cruz, C., Zamudio, M., Corona, A., González, U., y Rojas, A. (2016). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 99-115.
- Cuvi, N., y Bejarano, M. (2015). Los halos de inhibición en la remediación de suelos amazónicos contaminados con petróleo. *Departamento de Desarrollo, Ambiente y Territorio/Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales*, 1693-1714.
- Das, N., y Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*.

- Das, K., Mukherjee, A. K., y Singh, R. K. (2013). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil and water. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*, 1(4), 1-14.
- Delgadillo, R., Valdés, S., y Olalde, V. (2018). Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN*, 256-275.
- Díaz, J., Ricoy, C., Moreno, C., Ricoy, V., Pérez, V., y Valvuenza, O. (2013). Incorporación de alcanos por bacterias degradadoras de hidrocarburos mediada por una proteína de 70 KDA unida a membranas durante la biodegradación de combustible diesel. *Revista de Ciencia y Tecnología Venezuela - Interciencia*, 437- 442.
- Duery, O. (2014). Retrato microbiológico *Bacillus anthracis*. *Instituto de Salud Pública de Chile*, 457- 458.
- Elles, E. (2018). *Guía de laboratorio bromatología y microbiología de alimentos*. Corporación Universitaria Rafael Núñez.
- Erkmen, O. (2021). *Laboratory Practices in Microbiology*. Academic Press.
- Erkmen, O. (2022). *Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments*. Academic Press.
- Espinoza, E. (2020). La búsqueda de información científica en las bases de datos académicas. *Revista metropolitana de ciencias aplicadas*, 31-35.
- Figuroa, C. (2017). *Evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburos de petróleos de hongos y bacterias aislados del borde costero de la región del Bío-Bío para la aplicación de suelos cotaminados*. Chillán.
- Flores, A. (2016). *Universidad Autónoma de Baja California*. Obtenido de Microbiología y Biotecnología: https://ciencias.ens.uabc.mx/documentos/manuales/Manual_pra%CC%81cticas_Microbiologi%CC%81a_Biotecnologi%CC%81a.pdf

- Forero, D. (2020). *Logística de Hidrocarburos en Colombia*.
- Forhad, M., Akter, A., Rahman, S., Abu, N., y Faisal, K. (2022). Potencial de biorremediación de bacterias degradadoras de hidrocarburos: aislamiento, caracterización y evaluación. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 211-216.
- Fu, B., Wang, X., Zhang, Y., Xu, L., Sun, P., y Zhang, X. (2019). Biodegradation of crude oil by a newly isolated strain of *Pseudomonas stutzeri* under different environmental conditions. *PeerJ*, 7, e6865.
- Garibaldi, P. (2017). *Universidad Tecnológica Nacional*. Obtenido de Cátedra de Biotecnología:
https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicol.pdf
- Gallego, V. (2017). *Universidad Politécnica de Valencia*. Obtenido de Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento:
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/169378/GallegoPerez%20-%20Estimacion%20de%20la%20Densidad%20Celular.pdf?sequence=1>
- Galliazzi, A. (2017). Obtenido de Aislamiento y caracterización de bacterias desnitrificantes antárticas con potencial uso en biorremediación de diésel:
<https://dspace.ort.edu.uy/bitstream/handle/20.500.11968/3378/Material%20completo.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>
- Garzón, J., Rodríguez, P., y Hernández, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad y Salud - Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Universidad Distrital Francisco José de Caldas*. Bogotá, Colombia, 309-318.
- Gomes, R. (2019). *Hemograma, cómo hacer e interpretar*. Caracas: Amolca.
- Gómez, R., Jiménez, A., Medina, S., y Lizardi, M. (2017). Aislamiento y análisis cualitativo de biomasa microbiana fúngica degradadora de hidrocarburos

en un cenote de Quintana Roo. *Revista Internacional Contaminación Ambiental (Especial Biotecnología e ingeniería ambiental)*, 53-61.

Gómez, S., Sarmiento, L., y Delgado, D. (2015). Caracterización de microorganismos celulolíticos y amilolíticos de residuos sólidos orgánicos dispuestos en la planta Ecosangil del municipio de San Gil, Santander. *Revista Matices Tecnológicos.* , 30-38.

Gómez, G., y Sáiz, C. (2016). Biodeterioro de monumentos y biorremediación: estado actual . *Real Academia Nacional de Farmacia - Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología* , 562-579 .

González, E. (2021). Concepto y estrategias de biorremediación. *Revista UAN*, 20-29.

Goya, N. (2020). *Análisis de las estrategias para la biorremediación de suelos contaminados*. Universidad de Guayaquil.

Grande, J. (2019). Evaluación de la actividad biológica de los metabolitos extraídos de cepas de bacillus SP aisladas del estado de Tlaxcala . Puebla-Mexico.

Grutsch, A., Nimmer, P., Pittsley, R., y McKillip, J. (2018). *Bacillus spp. as Pathogens in the Industry*. United States: Ball State University, Muncie.

Guerrero, C. (2018). *Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas*. Obtenido de Poblaciones de bacterias, hongos y colémbolos durante la fitorremediación de suelo contaminado con diésel: <https://www.biopasos.com/biblioteca/Poblaciones-bacterias-hongos-fitorremediacion-suelo.pdf>

Gutiérrez, M. (2018). *Universidad Católica de Santa María*. Obtenido de Determinación de la capacidad de biodegradación de diésel efectuada por microorganismos acidófilos aislados de suelos contaminados con hidrocarburos: <https://core.ac.uk/reader/198132013>

- Guzmán, V., Ceruti, R., Marina, F., Simonetta, A., Manzo, R., y Mammarella, E. (2016). Ensayos de biodegradación de mezclas comerciales de diésel y biodiésel empleando cepas degradadoras aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos. *Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química*, 7-19.
- Hajabbasi, M. (2016). Importance of soil physical characteristics for petroleum hydrocarbons. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 10(11) 394-405.
- Hernández, P. (2021). Uso del microscopio óptico y esteroscópico. *Con-Ciencia Serrana Boletín Científico de la Escuela Preparatoria Ixtlahuaco*, 37-39.
- Hernández, J., Moragas, T., Cornella, J., y Martin, R. (2017). Remote carboxylation of halogenated aliphatic hydrocarbons with carbon dioxide. *Nature*, 545(7652), 84-88.
- Hermoza, M., Medina, O., Manrique, P., Barazorda, H., y Almirón, J. (2019). Análisis de la capacidad degradativa de diésel efectuada por microorganismos acidófilos y su aplicación individual y en consorcio en un sistema de biorremediación. *Revista Veritas - Universidad Católica Santa María*, 47-52.
- Holguín, J., Escobar, A., Monroy, P., y Muñoz, M. (2017). Remoción de colorantes reactivos empleando el hongo *Bjerkandera adusta*. *Informador Técnico (Colombia)*, 142-150.
- Hoyos, D., y Sánchez, R. (2017). Validación del efecto de remediación y refinación catalítica de los catalizadores EcoEvol y su efecto en la mejora en la performance de motores a combustión interna. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 223-241.
- Hosseinzadeh, H., Tabatabaei, M., Aghbashlo, M., Khanali, M., y Demirbas, A. (2018). A comprehensive review on the environmental impacts of diesel/biodiesel additives. *Energy Conversion and Management*, 579-614.

- Instituto Antártico Ecuatoriano. (2019). Expedición Antártica Ecuatoriana .
Revista del Instituto Antártico Ecuatoriano, 4-58.
- Jiménez, R., Valdés, E., y Olalde, V. (2018). Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 256-277.
- Jiménez, V. (2020). *Evaluación de Bacterias y Hongos potencialmente utilizables para la biorremediación de suelos contaminados por Hidrocarburos*. Guayaquil-Ecuador.
- Kafilzadeh, F., Naddafi, K., Nabizadeh, R., y Nasser, S. (2016). Biodegradation of crude oil by bacteria isolated from oil-contaminated soil. *Environmental Health Engineering and Management Journal*, 3(3), 143-147.
- Kaiser , G. (2021). *Aseptic Technique and Transfer of Microorganisms*. Community College Of Baltimore County, Catonsville Campus.
- Knutson, K. (2020). *Nobody is talking about environmental monitoring*. Academic Press.
- Krasimirova, L. (2020). *Universidad de Salamanca*. Obtenido de Los microorganismos extremófilos y sus aplicaciones biotecnológicas: https://digital.csic.es/bitstream/10261/230752/1/DIRECCION_DE_TRAB_AJOS825422.pdf
- Lafuente, W., Soto, L., López, C., y Domínguez, L. (2019). Efectos de un derrame de petróleo crudo en la comunidad de macroinvertebrados bentónicos de un río amazónico ecuatoriano. *Revista de Ciencias Ambientales*, 53(1), 1-22.
- Lama, D. (2017). Aislamiento y caracterización de bacterias con potencial producción de biosurfactantes para la degradación de aceite de cocina industrial. *Universidad de los Andes - Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental*, 1-13.

- Libkind, D., y Tognetti, C. (2016). *Curso teórico práctico sobre microscopía y recuento celular*.
- Li, Y., Song, L., Yan, K., Liu, Y., Liu, D., y Xu, H. (2019). Isolation and identification of petroleum hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum-contaminated soil and seawater. *Environmental science and pollution research international*, 26(23), 23923-23932.
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., y Shao, Z. (2017). Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Volume 67, Issue 8; 2499–2508.
- Loera, P., Pérez, S., y López, C. (2016). Biodegradación de compuestos aromáticos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 40-51.
- López, P. (2016). Microbiología del petróleo. *Geominas - Centro Regional de Investigaciones Ambientales de la Universidad de Oriente*, 139-148.
- Maier, R., Pepper, I., y Gerba, C. (2009). *Introduction to Environmental Microbiology (Second Edition)*. Academic Press.
- Manchego, H. (2021). Bacteria *Bacillus Safensis* en la degradación sobre hidrocarburos (gasolina) en laboratorio Arequipa 2021. *Universidad César Vallejo*.
- Mazeed, T., El-Ghwas, D., El-Waseif, A., Al-Zahrani, H., Almaghrabi, O., y Elazzazy, A. (2020). Factorial experimental design for optimization of zinc oxide nanoparticles production. *Current Nanoscience*, 16(1), 51-61.
- Martínez, C. (2018). Aislamiento y análisis independiente de comunidades productoras de polihidroxicanoatos y degradadoras de hexadecano en tapetes microbianos. *Centro de investigaciones biológicas del noreste*, 39-54.
- Martínez, J., Jiménez, M., Soto, D., Lomas, M., y Sánchez, S. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias hidrocarburohílicas degradadoras de

gasolina y diésel. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 155-161.

Martínez, J., Sánchez, J., Volke, T., Vallejo, V., Pérez, L., Duarte, P., . . . Márquez, L. (2021). *Remediación de suelos contaminados: fundamentos y casos de estudio*. Bogotá-Colombia: EAN.

Martínez, X. (2013). Producción de biosurfactantes por microorganismos aislados de sitios extremos y contaminados con hidrocarburos. *Instituto Politécnico Nacional - Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología*.

Medina, V., y Xiao, H. (2018). Ammonia for power. *Progress in Energy and combustion science*, 69, 63-102.

Mendonca, A., Thomas, E., y Gordon, A. (2020). *Microbiological considerations in food safety and quality systems implementation*. Academic Press.

Mendoza, R., Dorantes, E., Cedillo, J., y Jasso, X. (2017). El método estadístico de análisis discriminante como herramienta de interpretación del estudio de adicción al móvil, realizado a los alumnos de la Licenciatura en Informática; Administrativa del Centro Universitario UAEM Temascaltepec. *Revista Iberoamericana para la Investigación y el Desarrollo Educativo*, 105-189.

Mikán, F., y Castellanos, E. (2022). Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. *Universidad Militar Nueva Granada - Facultad de Medicina*, 58-70.

Miller, R., Beno, S., Kent, D., Carroll, L., Martin, N., Boor, K., y Kovac, J. (2016). *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments Open Access. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Volumen 66 Issue (11): 4744 – 4753.

- Ming, J., Wei, H., y Cheng, W. (2023). Retrospective Screening of Anthrax-like Disease Induced by *Bacillus tropicus* str. JMT from Chinese Soft-Shell Turtles in Taiwan. *Pathogens*, 2-18.
- Miranda, J., Martínez, S., Kenedy, Y., Figueroa, R., y Aguirre, N. (2017). *Diagnóstico de contaminación atmosférica por emisiones diésel en la zona metropolitana de San Salvador y Santa Tecla: cuantificación de contaminantes y calidad de combustibles*. Universidad Tecnológica de El Salvador.
- Mirre, J. (2018). *El timo del fin del petróleo: tenemos petróleo de sobra hasta finales del siglo XXI*. Madrid, Spain.: Bubok Publishing S.L.
- Mohseni-Bandpi, A., Alavi, S. A., y Rezaei, R. (2010). Biodegradation of petroleum hydrocarbons in a soil using native microbial consortia. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 7(2), 153-160.
- Mojiri, A., Zhou, J., Ohashi, A., Ozaki, N., y Kindaichi, T. (2019). Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments. *Science of the total environment*.
- Monroy , L. (2019). *Evaluación de la eficiencia del hipoclorito de sodio en endosporas de una cepa certificada de Bacillus subtilis*. Universidad Autónoma Del Estado De Hidalgo.
- Montalvo, C. (2018). Microscopía. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*, 5-18.
- Mora, R. (2019). Historia de los procesos del refino de petróleo. *Revista de la Sociedad Española para la Defensa del Patrimonio Geológico y Minero.*, (33), 87-112.
- Morales, B., y Ferruzo, E. (2019). *Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión*. Obtenido de Evaluación geológica del potencial de mineralización, zona Longreras Oeste, unidad minera El Porvenir, 2019: http://repositorio.undac.edu.pe/bitstream/undac/2111/1/T026_72453608_T.pdf

- Morales, G. (2017). Biorremediación de suelo contaminado con petróleo intemperizado mediante bioestimulación y bioaumentación en presencia de *Clitoria ternatea* L. *Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas*.
- Morales, S., y Muela, J. (2017). *Universidad Politécnica Salesiana de Quito*. Obtenido de Pruebas bajo invernadero de cepas de *Bacillus* como agentes de biocontrol de *Alternaria* spp y técnicas de conservación de cepas: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13545/1/UPS-QT11349.pdf>
- Morante, L. (2018). *Bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con hidrocarburos en el Cantón Quevedo*. Quevedo-Ecuador.
- Morrow, S. (2021). Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP). *Agencia Anadolu*, págs. 17-21.
- Novaes, C., Yamaki, R., Nascimento, J., Barreto, J., Velasques, G., y Becerra, M. (2017). Optimization of Analytical Methods Using Response Surface - Methodology – Part I: Process Variables. *Revista Virtual Química*, 1184-1215.
- Onco, I. (2018). Estudio de la toxicidad de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* como herramienta para optimizar el manejo de lepidópteros plaga de importancia agroeconómica. *Universidad de Buenos Aires - Área ciencias agropecuarias*, 19-26.
- Ortiz, D., y Silva, J. (2019). Efectos ambientales de los hidrocarburos. *Universidad Santiago de Chile - Especialización en Control de la Contaminación Ambiental*, 7-14. Obtenido de Efectos ambientales de los hidrocarburos.
- Ortuño, S. (2010). *El mundo del petróleo: origen, usos y escenarios*. México, Mexico:: Fondo de Cultura Económica.

- Ortúzar, P., Mcivor, E., NJastad, B., Soutullo, A., Rios, M., Ruberto, L., . . . MacCormack, W. (2020). Gestión y biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en Antártida. *Asuntos Antárticos*, Volumen VII/VI, 57.
- Patiño, M. (2020). Control biológico de la pudrición parda (*Monilinia fructicola*)(G. winter) Honey, con dos cepas de *Bacillus subtilis* en duraznero (*Prunus persica* [L.] batsch). Tunja-Colombia.
- Patiño, O. (2021). Biodegradación de petróleo por *Bacillus thuringiensis* como alternativa para la recuperación de suelos agrícolas. Escuela de Postgrado de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo (UNT), 339-348.
- Pedraza, L., López, C., y Uribe, D. (2020). Mecanismos de acción de *Bacillus* spp contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta Biológica Colombiana*, 112-125.
- Peñafiel, F. (2020). Determinación de bacterias con potencial en biodegradación de nitrobenzeno. *Universidad Técnica Estatal de Quevedo*.
- Peralta, R., Peralta, T., y Ordinola, A. (2021). Caracterización de cepas de *Vibrio* spp. biorremediadoras de petróleo aisladas de agua marina. *Manglar*, 18(1), 21-26.
- Pérez, A., Pérez, D., y Zorro, P. (2020). Biodegradación de petróleo crudo a partir de bacterias aisladas de un suelo contaminado con crudo . *Universidad Libre Bogotá*, 95-114.
- Pérez, M. (2018). *Evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando pseudomonas fluorescens*. Quito-Ecuador.
- Pérez , R., Camacho , M., Gómez, J., Ábalos, A., y Cantero , D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.*, 39(1), 044-051.

- Petit, K., Colina, J., Yegres, F., Morán, H., y Richard, N. (2016). Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de Aloe vera. *Revista Química Viva*, 26-38.
- Pincay, M. (2022). Diversidad microbiana presente en agua residual proveniente de industria atunera. *Revista ESPAMCIENCIA*, 13(1):60-66: https://doi.org/10.51260/revista_espamciencia.v13i1.31
- Pinto, L., y Sánchez, D. (2018). *Universidad Libre Colombia*. Obtenido de Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante la utilización de diferentes cepas bacterianas a escala de laboratorio: <https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/15451/Proyecto%20de%20investigaci%C3%B3n%20Biorremediaci%C3%B3n%20de%20suelos%20contaminados%20por%20hidrocarburos%20mediante%20la%20out.pdf?sequence=1>
- Puerto, W. (2019). *Desarrollo de un medio de cultivo de origen natural para el crecimiento de microorganismos con capacidad Ligninolítica*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Rabelo, R., y Márquez, A. (2022). 1Bacterias Gram negativas biodegradadoras de hidrocarburos. *Revista de Ciencias*, 4-20.
- Ramos, C. (2019). *Universidad del Valle*. Obtenido de Enriquecimiento de bacterias psicrófilas fijadoras de nitrógeno en reactores biológicos secuenciales: <https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/handle/10893/17830/CB0600171.pdf?sequence=1>
- Ramirez, S., Gallardo, S., Morales, O., García, L., y Rodríguez, L. (2017). Evaluación del proceso de reciclaje de una mezcla de aceites lubricantes usados en motores diesel mediante centrifugación y destilación atmosférica y a vacío. *Universidad Juárez Autónoma de Tabasco*, 83-90.
- Rasmussen, K., Rauscher, H., Mech, A., Sintes, J., Gilliland, D., González, M., y Bleeker, E. (2018). Physico-chemical properties of manufactured

nanomaterials - Characterisation and relevant methods. An outlook based on the OECD Testing Programme. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 8-28.

Refinería Petróleos de Escombreras, España. (2019). *Dirección General de Industria, Energía y Minas*. Obtenido de Consejería de Economía e innovación tecnológica: <https://www.fenercom.com/wp-content/uploads/2019/05/recorrido-de-la-energia-el-petroleo.pdf>

Realpe, E., Hernández, A., y Agudelo, I. (2019). Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Grupo Microbiología, Instituto Nacional de Salud*, 106-111.

Reyes, M. (2020). Bacterias y hongos con potencial biodegradador de hidrocarburos en diversos ambientes. En L. Arena X. Chiappa, *Microbiología ambiental en México* (págs. 246-262). Yucatán: Universidad Nacional Autónoma de México.

Rodríguez, C., y Zhurbenko, R. (2018). *Centro Nacional de Biopreparados*. Obtenido de Manual de Medios de Cultivo: <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>

Rodríguez, E. (2019). *Manual de trabajo para análisis biológicos en fangos activados*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/340415027_manual_de_trabajo_reducido

Rodriguez, N., McLaughlin, M., y Pennock, D. (2019). La contaminación del suelo: una realidad oculta. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Rolfe, M., Rice, C., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A., y Alston, M. (2012). Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology*, 686 - 701.

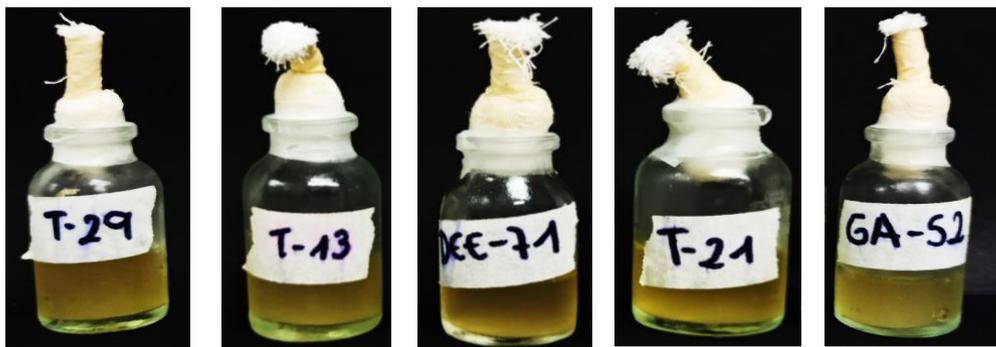
- Rojas, M., y Rengifo, N. (2021). *Universidad Nacional de Ucayali*. Obtenido de Biodegradación de petróleo por *Pseudomonas aeruginosa* en aguas de derrame de la actividad petrolera: http://repositorio.unu.edu.pe/bitstream/handle/UNU/5316/B4_2022_UNU_ECONOMIA_2022_T_ABIGAIL-ROJAS-GARCIA_ET_AL.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ruiz, A. (2019). La Biorremediación Como Técnica Para La Descontaminación De Suelos Contaminados. Acacias- Colombia.
- Salinas, D. (2019). Evaluación del potencial celulolítico por bacterias y hongos a diferentes concentraciones de diésel de suelo no perturbado y disturbado del Piedemonte Llanero obtenido del Instituto Agrícola Guacavía en el Municipio de Cumaral. *Universidad Santo Tomás*.
- Sánchez, J., Correa, M., y Castañeda, L. (2016). *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Facultad Nacional de Salud Pública*, 230-242.
- Santos, A., Troncoso, C., Lamilla, C., Llanquino, V., Pávez, M., y Barrientos, L. (2017). Nanopartículas Sintetizadas por Bacterias Antárticas y sus Posibles Mecanismos de Síntesis. *Núcleo Científico y Tecnológico en Biorecursos - Universidad de La Frontera, Temuco - Chile*, 26-33.
- Santos, K. (2020). Evaluación de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas a partir de un contenedor de aceite usado de motor. *Universidad Técnica del Norte*.
- Sarathy, S., Farooq, A., y Kalghatgi, G. (2018). Recent progress in gasoline surrogate fuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, 65, 67-108.
- Secretaría Nacional de Planificación. (2021). *Plan de Creación de Oportunidades 2021-2025*. En Gobierno del Encuentro.
- Shibazaki, M., Sugawara¹, T., Nagai, K., Shimizu, Y., Yamaguchi, H., y Suzuki, K. (2016). Novel Antifungal Antibiotic Produced by *Bacillus* sp. *The Journal of Antibiotics*, 340-345.

- Speight, J. (2016). *Environmental Organic Chemistry for Engineers*. Butterworth-Heinemann.
- Toledo, H., Barrios, Y., Plá, A., Romero, R., Y Acosta, S. (2022). Diseño y caracterización de un consorcio bacteriano para la degradación de recortes de perforación a base de diésel. *Revista CENIC Ciencias Químicas*.
- Úbeda, M., Flores, M., y Aguilera, L. (2017). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente a hongos patógenos. *Revista Universidad Nacional de Ingeniería*, 96-110.
- Universidad Continental. (2021). Guías de laboratorio. Microbiología Ambiental, 5-20.
- Usón , A., Boixadera, J., Martín, A., y Bosch , Á. (2010). Tecnología de suelos: estudio de casos. Zaragoza-España: Prensas Universitarias de Zaragoza.
- Vásquez, K. (2021). Remoción de hidrocarburos totales mediante bacterias aisladas de la Laguna Tampamachoco en Tuxpan, Veracruz. *Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache*.
- Velásquez, J. (2017). Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Revista de investigación Agraria y Ambiental*, 8(1), 151-167.
- Vega, H., y Ugaz, E. (2016). Rendimiento de surfactantes producidos por *Pseudomonas* spp. degradadoras de hidrocarburos de petróleo. *Departamento Académico de microbiología y parasitología*.
- Verdesoto, M. (2018). *Universidad Politécnica Salesiana de Quito*. Obtenido de Identificación microbiológica y molecular mediante PCR en tiempo real de dos bacterias del género *Bacillus*: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15698/1/UPS-QT12847.pdf>

- Villalta, D. (2017). *Universidad de Guayaquil - Facultad de Ciencias Naturales*. Obtenido de Estudio polifásico de bacterias psicrófilas colectadas en la isla Greenwich, Bahía Chile (Continente Antártico): https://www.google.com/search?q=acumulacion+sinonimos&rlz=1C1UUXU_esEC1001EC1001&oq=acumulacion+sinonimos&aqs=chrome..69i57.3543j0j15&sourceid=chrome&ie=UTF-8
- Villareal, F., Villa, E., Cira, A., y Estrada, I. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 95-130.
- Vizuite, R., Lascano, A., y Moreno, R. (2019). Análisis econométrico en la gravedad de un derrame petrolero y su contaminación ambiental. Caso de estudio: Campo Sacha -Ecuador. *Espacios*, Volumen 40: 24-32.
- Wang, X., Yao, X., y Müllen, K. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the graphene era. *Science China Chemistry*, 62(9).
- Wang, Y., Dong, F., Wang, J., Zhang, Q., y Liu, S. (2016). Biodegradation characteristics of diesel in soils of different ecological regions in China. *Science of the Total Environment*, 562, 330-336.
- Wang, Y., Wan, D., Wang, X., Tao, H., Feng, E., Zhu, L., . . . Wang, H. (2019). Highly Efficient Genome Engineering in *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* Using the CRISPR/Cas9 System. *Frontiers in Microbiology*, 1-9.
- Zarate, Y. (2018). Evaluación del impacto de la contaminación con diésel en las propiedades mecánicas de un suelo arcilloso. Queretaro-Mexico: Centro Universitario.
- Zhao, Y., Chen, C., Gu, H., Zhang, J., y Sun, L. (2019). Characterization of the Genome Feature and Toxic Capacity of a *Bacillus wiedmannii* Isolate From the Hydrothermal Field in Okinawa Trough. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Volume 9.

ANEXOS

Anexo 1. Reactivación de cepas de *Bacillus sp.* en caldo nutriente.

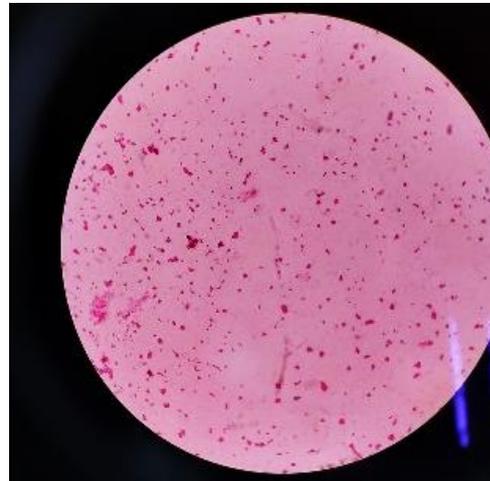


Anexo 2. Tinción diferencial de Gram durante la fase de reactivación.

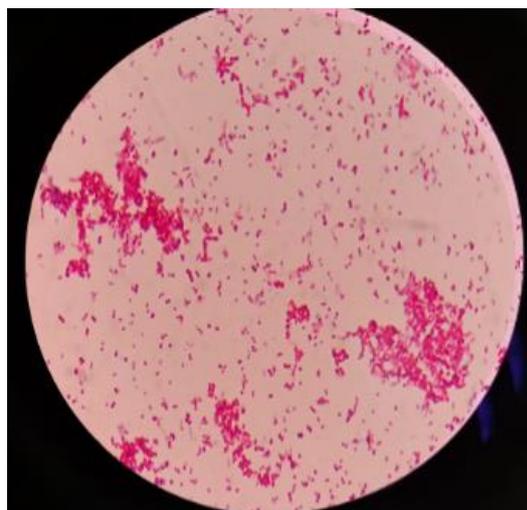
GA-52



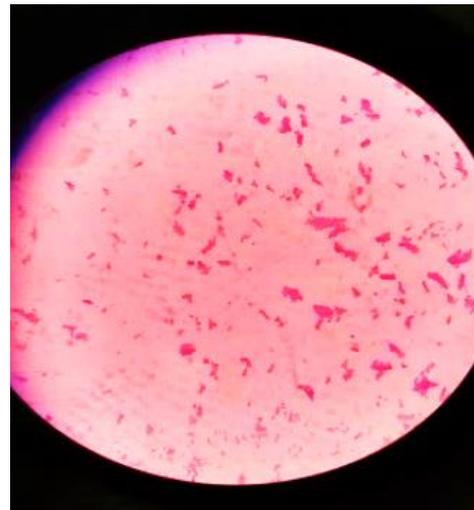
T-29



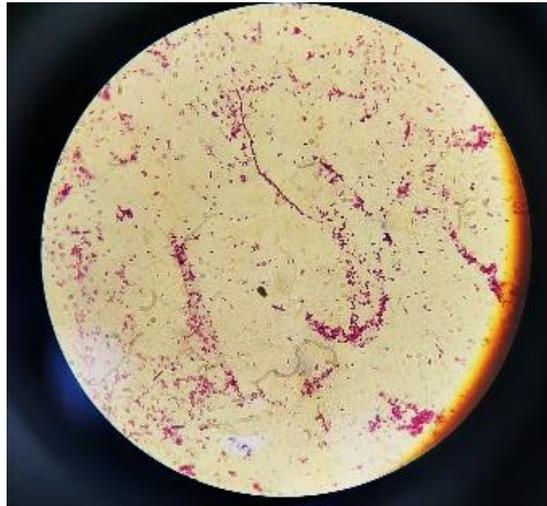
T-13



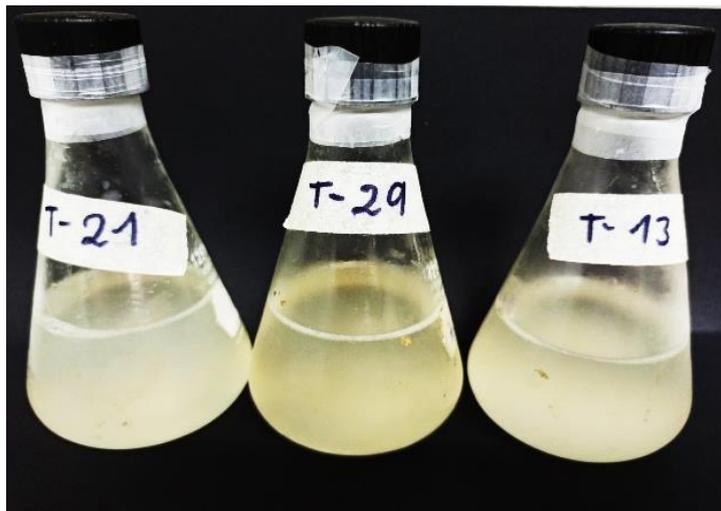
DEE-71



T-21



Anexo 3. Acondicionamiento de las cepas de *Bacillus* sp. al diésel.



Anexo 4. Crecimiento del halo bacteriano y colonias de *Bacillus* sp. con respecto al tiempo (24, 28 y 72 horas).

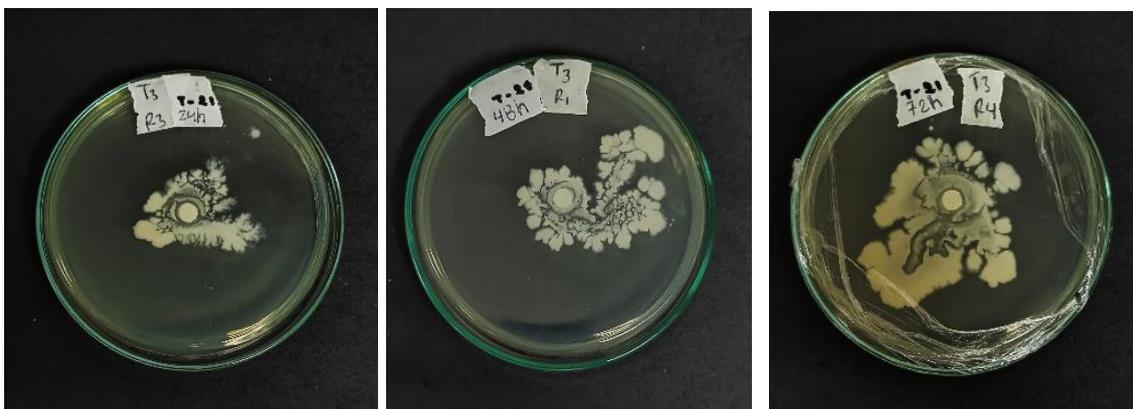
GA-52



T-29



T-21



T-13



DEE-71



Anexo 5. Registro del diámetro de halos y porcentajes de biodegradación de diésel en función del tiempo de evaluación (24, 28 y 72 horas).

Registro (24 horas)						
Área de caja de Petri (6361,72 mm ²)						
Tratamientos (Cepas)	Repeticiones	∅ Halo de cepa (mm)	∅ Halo de colonia (mm)	Σ halo colonia y cepa	Área halo de degradación (mm ²)	% Biodegradación
GA-52	R1	49	5	54	1885,74	29,6%
T-29	R1	26	7	33	530,93	8,35%
T-21	R1	22	5,75	27,75	380,13	5,98%
T-13	R1	25,5	3	28,5	510,71	8,03%
DEE-71	R1	19	9	28	283,53	4,46%
GA-52	R2	37	5	42	1075,21	16,90%
T-29	R2	32	6	38	804,25	12,64%
T-21	R2	18	3,25	21,25	254,47	4,00%
T-13	R2	17,5	3,75	21,25	240,53	3,78%
DEE-71	R2	26	8,33	34,33	530,93	8,35%
GA-52	R3	46	5	51	1661,90	26,12%
T-29	R3	29	4	33	660,52	10,38%
T-21	R3	31	8,2	39,2	754,77	11,86%
T-13	R3	13	4,25	17,25	132,73	2,09%
DEE-71	R3	26	7	33	530,93	8,35%
Registro (48 horas)						
GA-52	R1	52	5	57	2123,72	33,38%
T-29	R1	23	12	35	415,48	6,53%
T-21	R1	44	6,25	50,25	1520,53	23,90%
T-13	R1	42,5	4,5	47	1418,63	22,30%
DEE-71	R1	30	7,5	37,5	706,86	11,11%
GA-52	R2	56	7	63	2463,01	38,72%
T-29	R2	27,5	9	36,5	593,96	9,34%
T-21	R2	20,5	4,33	24,83	330,06	5,19%
T-13	R2	39,5	6,25	45,75	1225,42	19,26%
DEE-71	R2	41	11	52	1320,25	20,75%
GA-52	R3	51	6	57	2042,82	32,11%
T-29	R3	39,5	14	53,5	1225,42	19,26%
T-21	R3	38,5	25	63,5	1164,16	18,30%
T-13	R3	40,5	6,2	46,7	1288,25	20,25%
DEE-71	R3	37,5	7,5	45	1104,47	17,36%

Registro (72 horas)						
GA-52	R1	52,5	50	102,5	2164,75	34,03%
T-29	R1	62,5	23	85,5	3067,96	48,23%
T-21	R1	62,5	6,83	69,33	3067,96	48,23%
T-13	R1	55	12	67	2375,83	37,35%
DEE-71	R1	53,5	11,75	65,25	2248,01	35,34%
GA-52	R2	66	48	114	3421,19	53,78%
T-29	R2	52,5	14	66,5	2164,75	34,03%
T-21	R2	52,5	19	71,5	2164,75	34,03%
T-13	R2	52	14	66	2123,72	33,38%
DEE-71	R2	41	9	50	1320,25	20,75%
GA-52	R3	73,5	43	116,5	4242,92	66,69%
T-29	R3	61	29	90	2922,47	45,94%
T-21	R3	53	30	83	2206,18	34,68%
T-13	R3	55,5	12,5	68	2419,22	38,03%
DEE-71	R3	46,5	7	53,5	1698,23	26,69%

Anexo 6. Tratamiento (cepas) y porcentaje de biodegradación de diésel por bloques (DISEÑO DBCA)

Tratamientos (Cepas)	B1_24 HORAS					B2_48 HORAS					B3_72 HORAS				
	∅ Halo de cepa (mm)	∅ Halo de colonia (mm)	Σ halo colonia y cepa	∅ Halo de degradación (mm)	% Biodegradación	∅ Halo de cepa (mm)	∅ Halo de colonia (mm)	Σ halo colonia y cepa	∅ Halo de degradación (mm)	% Biodegradación	∅ Halo de cepa (mm)	∅ Halo de colonia (mm)	Σ halo colonia y cepa	∅ Halo de degradación (mm)	% Biodegradación
GA-52	44	5	49	1540,95	24%	53	6	59	2209,85	35%	64	47	111	3276,29	52%
T-29	29	5,67	34,67	665,23	10%	30	11,67	41,67	744,95	12%	58,67	22	80,67	2718,39	43%
T-21	23,67	5,73	29,4	463,12	7%	34,33	11,86	46,19	1004,92	16%	56	18,61	74,61	2479,63	39%
T-13	18,67	3,67	22,33	294,66	5%	40,83	5,65	46,48	1310,77	21%	54,17	12,83	67	2306,26	36%
DEE-71	23,67	8,11	31,78	448,46	7%	36,17	8,67	44,83	1043,86	16%	47	9,25	56,25	1755,50	28%
	Media (B1_24H)			682,48533	11%	Media (B2_48H)			1262,87	20%	Media (B3_72H)			2507,21	39%

B1_24H: Bloque 1 a las 24 horas; **B2_48H:** Bloque 2 a las 48 horas; **B3_72H:** Bloque 3 a las 72 horas

Anexo 7. Análisis de varianza y test de Tukey en el porcentaje de biodegradación de diésel

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	Aj	CV
% Biodegradación	15	0,95	0,91	18,52

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,29	6	0,05	25,56	0,0001
Bloques	0,21	2	0,11	57,49	<0,0001
Tratamientos (cepas)	0,07	4	0,02	9,59	0,0038
Error	0,01	8	1,9E-03		
Total	0,30	14			

Test: Tukey Alfa= 0,05

DNS=0,12192

Error: 0,0019 gl: 8

Tratamiento (cepas)	Medias	n	E.E
DEE-71	0,17	3	0,02 A
T-13	0,21	3	0,02 A
T-21	0,22	3	0,02 A
T-29	0,22	3	0,02 A
GA-52	0,37	3	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test: Tukey Alfa= 0,05

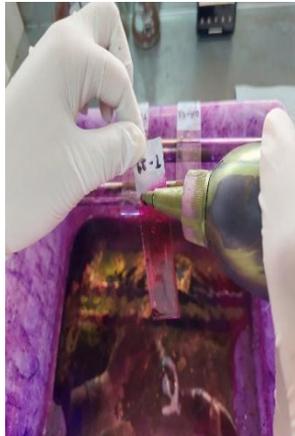
DNS=0,07811

Error: 0,0019 gl: 8

Tratamiento (cepas)	Medias	n	E.E
24 horas	0,11	5	0,02 A
48 horas	0,20	5	0,02 B
72 horas	0,39	5	0,02 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Anexo 8. Proceso de reactivación de bacterias



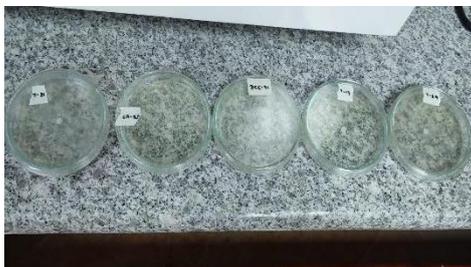
Anexo 9. Proceso de acondicionamiento de *Bacillus* sp. al medio de sales minerales y diésel.





Anexo 10. Proceso de cultivo y crecimiento de *Bacillus* sp.





Anexo 11. Proceso de medición de halos bacterianos desarrollados por las cepas en 24, 48 y 72 horas.

