



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Bioprospección de microorganismos autóctonos productores de biosurfactantes aislados de suelos contaminados con aceites de lubricadoras en Ambato. Articulado al Proyecto de Investigación aprobado mediante Resolución Nro. UTA-CONIN-2023-0294-R.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Guerrero Carranza Yadira Lizbeth

Tutor: Dr. William Ricardo Calero Cáceres

Ambato – Ecuador

Febrero - 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulación y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología

Ambato, 16 de enero del 2025

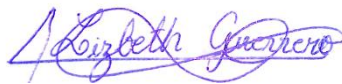
Dr. William Ricardo Calero Cáceres

17143448859

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Yadira Lizbeth Guerrero Carranza, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Yadira Lizbeth Guerrero Carranza

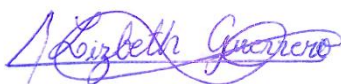
1805241153

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Yadira Lizbeth Guerrero Carranza
1805241153

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:

Presidente del Tribunal

Mg. María Eugenia García Pazmiño
C.I. 2100248505

Mg. Manoella Alejandra Sánchez Garnica
C.I. 0604079871

Ambato, 30 de enero del 2025

DEDICATORIA

“Los tiempos difíciles nunca duran, pero las personas fuertes sí”

(Robert H. Schuller)

A Dios y la Virgencita del Guayco,

Por ser mi fortaleza en todo el proceso que he vivido en el transcurso de este sueño.

A mis padres Jaime y Estela, mi hermano Diego y mi prometido Alexander,

Por su paciencia, comprensión y apoyo incondicional a lo largo de mis estudios. Los amo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco inmensamente a Dios y a la virgencita del Guayco, por ser la luz en mis tinieblas, quienes sustentan mi caminar y me han permitido culminar mi vida universitaria, junto a los seres que más amo, mi familia.

Agradezco profundamente a mis padres, Jaime y Estela, por ser mi soporte incondicional en mi proceso académico y personal, por ser un gran ejemplo de amor, unión y confianza, gracias papitos por enseñarme la importancia de la educación, de la familia y sobre todo por creer siempre en mí, sin ustedes este sueño no hubiera sido posible.

A mi hermano Diego, por ser quien siempre ha confiado en mí y me ha apoyado en momentos difíciles, gracias por tu ayuda incondicional.

A mi prometido Alexander, por demostrarme todos los días el verdadero significado del amor, aquel amor que siempre ha estado presente en momentos felices y sobre todo en momentos difíciles, por su paciencia, compañía y respaldo, porque sé que ya nunca estaré sola teniéndole junto a mí.

Al equipo UTA RAM y a mi tutor por su guía y comprensión; a mis queridos amigos del laboratorio, Juli, Eri y Richi por ser verdaderos amigos que la vida y Dios me dio, los quiero mucho, gracias por brindarme siempre su apoyo, espero que esta amistad perdure de por vida, se merecen lo mejor.

A mis amigos Marce, Adry, Bruce, por estar para mí siempre que los he necesitado, apoyo y amistad incondicional, que Dios les bendiga siempre y guíe sus caminos.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN EJECUTIVO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes Investigativos	1
1.2. Objetivos	12
1.2.1. Objetivo general:	12
1.2.2. Objetivos específicos:.....	12
2. CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	13
2.1. Materiales	13
2.2. Métodos.....	16
2.2.1. Aislamiento y purificación de cepas bacterianas con capacidad de producción de biosurfactantes.	16
2.2.2. Criopreservación y recuperación de aislamientos bacterianos	17
2.2.3. Actividad hemolítica	18
2.2.4. Ensayo del colapso de la gota por caída	18
2.2.5. Ensayo de emulsificación	19
2.2.6. Ensayo de agar CTAB	20
2.2.7. Ensayo de propagación de aceite	21

2.2.8. Identificación de cepas bacterianas mediante MALDI-TOF	21
2.2.9. Tipificación molecular por el Consenso Intergénico Repetitivo de Enterobacterias (ERIC) PCR	22
2.2.10. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en pocillos de agar	22
2.2.11. Evaluación de la capacidad de biodegradación de las cepas seleccionadas sobre aceite mediante análisis gravimétrico.	23
3. CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1 Análisis y discusión de resultados.	25
3.2. Biodegradación de aceite	36
3.2. Hipótesis	41
4. CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	42
4.1. Conclusiones	42
4.2. Recomendaciones	43
5. Bibliografía:	45
6. Anexos	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de biosurfactantes según el microorganismo de origen.....	10
Tabla 2 Materiales necesarios para el desarrollo del proyecto de titulación.	13
Tabla 3. Insumos y materiales de escritorio.	15
Tabla 4 Ensayos realizados para conocer a bacterias productoras de biosurfactantes.	25
Tabla 5 Resultados de la identificación de los aislamientos por MALDI-ToF.....	29
Tabla 6 Resultados positivos obtenidos de las pruebas realizadas para encontrar los aislamientos con capacidad de producción de biosurfactantes.	31
Tabla 7 Actividad antimicrobiana de los filtrados libres de células vs E. coli.....	34
Tabla 8 Actividad antimicrobiana de los filtrados libres de células vs S. enterica	34
Tabla 9 Actividad antimicrobiana de los filtrados libres de células vs S. aureus.....	35
Tabla 10 Actividad antimicrobiana de los filtrados libres de células vs B. cereus.	35
Tabla 11 Biodegradación del aceite sin sustrato.....	39
Tabla 12 Biodegradación del aceite con sustrato.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo	5
Figura 2. Preparación del medio de cultivo Bushnell Hass para obtener un cultivo puro después de 7 días de incubación.....	16
Figura 3. Las fases de realización necesarias para llegar a realizar los filtrados de los aislados bacterianos.....	17
Figura 4. Evaluación de la actividad de hemólisis realizada con los filtrados libres de células.....	18
Figura 5. Ensayo del colapso de la gota realizada con los filtrados libres de células.	19
Figura 6. Ensayo de emulsificación realizada con los filtrados libres de células.	20
Figura 7. Ensayo del agar CTAB realizada con los filtrados libres de células.	20
Figura 8. Ensayo de la propagación del aceite con los filtrados libres de células.....	21
Figura 9. Protocolo de ERIC PCR y Electroforesis en gel de agarosa.	22
Figura 10. Indica la actividad antimicrobiana.	23
Figura 11. Proceso realizado para el análisis de la biodegradación del aceite.	24
Figura 12. La espuma formada representa a la capacidad para reducir la tensión superficial por parte de los aislados bacterianos.	28
Figura 13. ERIC-PCR: Relación filogenética entre las cepas de <i>P. aeruginosa</i> productoras de biosurfactantes.	30
Figura 14. Biodegradación de aceite sin sustrato (aceite comestible como fuente de carbono) después de dos semanas de incubación.	36
Figura 15. Biodegradación del segundo ensayo con sustrato (aceite comestible + melaza+ azúcar como fuente de carbono) después de dos semanas de incubación.....	37
Figura 16. Biodegradación del primer ensayo a través del método gravimétrico.	38
Figura 17. Biodegradación del segundo ensayo a través del método gravimétrico.	38
Figura 18. Comparación de la eficiencia en la biodegradación de petróleo entre diferentes cepas bacterianas y el control mediante el análisis de TPHs.....	40

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Coordenadas de los puntos de muestreo.	60
Anexo 2. Representación de los controles positivo y negativo del ensayo del colapso de la gota por caída.....	61
Anexo 3. Ensayo de colapso de la gota por caída con aceite comestible con colorante (morado) y aceite lubricante usado (ALU)(amarillo).	61
Anexo 4. Gel de electroforesis con muestras positivas para el gen ERIC PCR.....	62
Anexo 5 Método gravimétrico de los 7 días sin sustrato.....	63
Anexo 6 Método gravimétrico de los 14 días sin sustrato.....	63
Anexo 7 Método gravimétrico de los 7 días con sustrato.....	64
Anexo 8 Método gravimétrico de los 14 días con sustrato.....	65
Anexo 9. Análisis de varianza (ANOVA).....	65
Anexo 10. Indica las interacciones de los tres factores evaluados de Tiempo*Tipo de bacteria*Medio de cultivo en los días 0 y 14 días.....	66
Anexo 11. Interacciones de los tres factores evaluados de Tiempo, Tipo de bacteria, y medio de cultivo.....	66
Anexo 12. Indica las interacciones del medio de cultivo con y sin sustrato en el ensayo gravimétrico.	67

RESUMEN EJECUTIVO

La contaminación por hidrocarburos representa una problemática global debido a su alta toxicidad y recalcitrancia. Esto se debe principalmente al uso indiscriminado de aceites de diversas clases, que van desde los alimenticios hasta los lubricantes de motores. En particular, los aceites de motor tienen un impacto significativo en el suelo, ya que su naturaleza pesada y su baja dispersión en agua reducen la biodisponibilidad de los hidrocarburos para los microorganismos. Este fenómeno deteriora la estructura del suelo a largo plazo. En el presente estudio se aislaron, identificaron y caracterizaron bacterias presentes en suelos contaminados con aceites provenientes de lubricadoras de la ciudad de Ambato. Es fundamental destacar que los biosurfactantes, compuestos tensoactivos de origen microbiano, desempeñan un papel clave en este contexto. Para identificar las bacterias productoras de biosurfactantes, se llevaron a cabo diversas pruebas, entre ellas la prueba del colapso por caída de gotas, la propagación del aceite, la actividad hemolítica, la emulsificación y el uso de agar CTAB. Posteriormente, las cepas productoras de biosurfactantes fueron identificadas mediante la técnica MALDI-TOF, determinando su género y especie. Los resultados revelaron que las bacterias correspondían a *Pseudomonas aeruginosa*, conocidas por producir ramnolípidos, un tipo de biosurfactante. Además, se evaluó su actividad antimicrobiana y se investigó la similitud filogenética de estas cepas utilizando la técnica ERIC-PCR. Finalmente, se realizó un estudio de biodegradación de aceite, comparando condiciones de presencia y ausencia de sustrato para analizar las diferencias en el proceso.

Palabras clave: Recalcitrancia, biosurfactantes, ramnolípidos, biodegradación, gestión ambiental.

ABSTRACT

Hydrocarbon contamination represents a global issue due to its high toxicity and recalcitrance. This is mainly attributed to the indiscriminate use of oils of various types, ranging from edible oils to motor lubricants. In particular, motor oils have a significant impact on soil, as their heavy nature and low dispersion in water reduce the bioavailability of hydrocarbons for microorganisms. This phenomenon deteriorates soil structure over time. In this study, bacteria present in soils contaminated with oils from lubricant workshops in the city of Ambato were isolated, identified, and characterized. It is essential to highlight that biosurfactants, surfactant compounds of microbial origin, play a key role in this context. To identify biosurfactant-producing bacteria, various tests were performed, including the drop collapse test, oil spreading, hemolytic activity, emulsification, and the use of CTAB agar. Subsequently, biosurfactant-producing strains were identified using the MALDI-TOF technique to determine their genus and species. The results revealed that the bacteria belonged to *Pseudomonas aeruginosa*, known for producing rhamnolipids, a type of biosurfactant. Additionally, their antimicrobial activity was evaluated, and the phylogenetic similarity of these strains was investigated using the ERIC-PCR technique. Finally, an oil biodegradation study was conducted, comparing conditions with and without substrate enrichment to analyze process differences.

Keywords: Recalcitrance, biosurfactants, rhamnolipid, biodegradation, environmental management.

1. CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

La implementación de tecnologías para la remediación de sitios contaminados por hidrocarburos representa un gran desafío, dado las características intrínsecas de los hidrocarburos (peso molecular, estructura química, solubilidad, sustituyentes químicos), así como su recalcitrancia y toxicidad **(Pandolfo et al., 2023)**. Se conoce que, una vez estos compuestos ingresan al suelo, se adhieren a la materia orgánica y a los componentes inorgánicos presentes en él **(Liao et al., 2019)**. Las partículas, tanto finas como gruesas se unen fuertemente a través de varias reacciones, provocando una compactación del suelo, lo que reduce la disponibilidad de hidrocarburos para la remediación **(Pacwa-Plociniczak et al., 2011)**. Existen varios métodos aplicables para tratar este tipo de contaminaciones, sin embargo son poco eficientes y resultan demasiado costosos **(Suganthi et al., 2018)**. Por el contrario, la biorremediación es un método eficaz y ecológico para eliminar diversos contaminantes al utilizar microorganismos **(Guirado et al., 2023)**.

Actualmente, los biosurfactantes han ganado gran relevancia en los procesos de biorremediación, debido a su capacidad para reducir la tensión superficial y mejorar la biodegradación de contaminantes **(Lu et al., 2019)**. Los biosurfactantes son moléculas tensoactivas producidas por microorganismos, que tienen la capacidad de aumentar la superficie de las sustancias hidrófobas, y de esta manera aumentan la biodisponibilidad de los contaminantes para su posterior degradación **(Soares da Silva et al., 2019)**. De acuerdo con **Gurkok (2022)**, los biosurfactantes bloquean la formación de puentes de hidrógeno y permite las interacciones hidrófilas- hidrófobas que disminuye la tensión superficial del líquido al aumentar su superficie. Asimismo, para que la producción de biosurfactantes sea competitiva frente a los métodos de remediación tradicionales, es fundamental la adecuada selección y cribado de microorganismos con esta capacidad **(Gurkok, 2022)**. Las investigaciones centradas en la bioprospección y caracterización de microorganismos autóctonos productores de biosurfactantes pueden representar una fuente confiable para aplicaciones ambientales e industriales **(Ray et al., 2021)**.

En consecuencia, esta investigación propone la bioprospección de microorganismos autóctonos con la capacidad de producir biosurfactantes, con el objetivo de sentar las bases para futuras investigaciones en esta área. La identificación y caracterización de estos microorganismos no solo contribuirá al desarrollo de nuevas tecnologías de biorremediación, sino que también permitirá la creación de soluciones más eficientes y sostenibles para la gestión de suelos contaminados por hidrocarburos.

1.1.1. Contaminación con hidrocarburos en los suelos

La industrialización global y los procesos de desarrollo económicos contemporáneos han estado directamente ligados a la utilización de derivados de petróleo. No obstante, el uso excesivo de combustibles fósiles ha causado serios problemas ambientales y ha perjudicado la salud humana y de otras especies debido a su ecotoxicidad **(Koshlaf et al., 2017)**. Los procesos de exploración, extracción, transporte y procesamiento de petróleo han provocado graves impactos ambientales en todo el mundo; los cuales incluyen la contaminación de suelos y cuerpos de agua, la destrucción de hábitats naturales, la emisión de gases de efecto invernadero, y la afectación a la biodiversidad **(Abdulredha et al., 2020; Garzón et al., 2023)**.

Las principales fuentes de contaminación por derivados de petróleo se causan por accidentes en el transporte de camiones, fugas de los tanques de almacenamiento subterráneos corroídos, como en gasolineras, en la extracción y liberación de residuos oleosos producidos por industrias que elaboran plásticos, disolventes, productos farmacéuticos y cosméticos **(Souza et al., 2014)**. Pese a que, las refinerías son beneficiosas para la sociedad en el ámbito económico, los residuos generados son peligrosos al no poder ser reutilizados ni reciclados por su alta inflamabilidad, corrosión, toxicidad y patogenicidad **(Khan et al., 2018)**.

La Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (US EPA) evalúa que cada año se producen en el país más de 2,500 millones de galones de vertidos de petróleo **(Azevedo, 2007)**. Estudios realizados por **Talvenmäki et al. (2019)**, sugieren que Finlandia tiene alrededor de 23.000 sitios contaminados, siendo los derrames de petróleo un contribuyente importante. Los tanques de almacenamiento subterráneos existentes en Canadá presentan el 35% en fugas, lo que es realmente alarmante **(Gitipour, 2015)**. Además, Irán posee el 8,58% de los yacimientos petrolíferos mundiales y una enorme producción de petróleo y varios oleoductos lo que se traduce en graves problemas de contaminación **(Gitipour, 2015)**.

La mayor parte de contaminación es producida por lodos de perforación, aguas residuales contaminadas por hidrocarburos, residuos sólidos y aceites lubricantes usados. Este último, tiene un gran impacto en el ambiente al ser un residuo peligroso que al tener un mal tratamiento puede causar daños irreparables a las alcantarillas, ríos y suelos **(Las Naciones Unidas, 2023)**. De este modo, en Ecuador se tiene un registro aproximando de 1,668 lugares encargados del cambio y servicios de lavado de autos, la mayoría de estos no cuentan con licencias ambientales que regularicen el cumplimiento del tratamiento del agua contaminada, casi siempre se debe al desconocimiento del daño que puede provocar **(Guilcamaigua et al., 2019)**.

1.1.2. Composición y toxicidad de los hidrocarburos de petróleo

El petróleo es un compuesto líquido de color negro, con alta viscosidad y con una composición química compleja al contener miles de compuestos de la familia de hidrocarburos **(Güleç & Kabak, 2024)**. De forma general, el petróleo crudo representa una mezcla orgánica homogénea y compleja de múltiples componentes, entre los que destacan los hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, resinas, asfaltenos y compuestos orgánicos hetero funcionalizados que contienen nitrógeno, azufre y oxígeno **(Chen et al., 2018)**. El petróleo y sus productos derivados pueden ser tóxicos para los seres humanos y el medio ambiente; cuya toxicidad depende de su composición, la cual varía según la fuente del crudo y los aditivos que contenga **(Ramirez et al., 2017)**.

Algunos componentes del petróleo y sus derivados, especialmente los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), estos son compuestos formados por anillos bencénicos que en su mayoría son sólidos cristalinos a temperatura ambiente y que poseen un olor característico **(Reategui, 2017)**; los cuales presentan una elevada toxicidad, ya que son causantes de cáncer, defectos de nacimiento u otros daños reproductivos **(Wang et al., 2021)**. La absorción de estos contaminantes puede ocurrir por ingestión, inhalación o exposición dérmica al suelo contaminado, lo que puede provocar cáncer o mutaciones tanto en seres humanos como en animales **(Kuppusamy et al., 2019)**. Los contaminantes HAP presentan un origen tanto petrogénico como pirogénico, donde, el petrogénico que viene dado por el uso del petróleo, combustibles fósiles en diversas actividades industriales, mientras que el pirogénico, es provocado por plantas de energía, operaciones industriales y motores de vehículos, debido a la combustión incompleta de materia orgánica como el uso de la gasolina, petróleo, carbón y diésel **(Rios et al., 2023)**.

Los aceites crudos y refinados son las principales fuentes de contaminación petrogénica al estar contruibidos en su mayoría por HAPs de bajo peso molecular dotados con 2 a 3 grupos alquilo. En cambio, las fuentes pirogénicas están vinculadas a HAPs más pesados que contengan alrededor de 4 a 6 anillos fusionados **(Pies et al., 2008)**. Las propiedades fisicoquímicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) varían según su peso molecular y estructura. A medida que aumenta el peso molecular, también lo hace la resistencia a las reacciones de oxidación y reducción. Los HAPs son altamente lipofílicos, lo que significa que son miscibles en disolventes orgánicos **(Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2019)**. La solubilidad acuosa de los HAPs disminuye con cada anillo adicional, lo que los hace altamente dispersables en el medio ambiente, repartiéndose entre aire, suelo y agua. Al mezclarse con el agua, los HAP tienden a filtrarse en el suelo, reduciendo su calidad y productividad; Además, estos compuestos son tóxicos incluso en bajas concentraciones **(Dai et al., 2022)**. Cuando los HAPs se liberan a la atmósfera se encuentran tanto en fase de vapor como sólida. Presentan sensibilidad a la luz, resistencia al calor y la corrosión, también

de su actividad fisiológica. Además, los HAP poseen espectros de absorción UV, lo que los hace fluorescentes **(Masih et al., 2012)**.

Desde el punto de vista ambiental, los principales impactos biológicos de la contaminación por hidrocarburos de petróleo incluyen el bloqueo del suministro de agua, nutrientes, oxígeno y luz **(Al-Rubaye et al., 2023)**. Esto conduce a la infertilidad del suelo, afectando negativamente el desarrollo y la germinación de las plantas **(Varjani et al., 2017)**. Además, la fijación de los hidrocarburos a las partículas del suelo reduce su biodisponibilidad para los microorganismos, limitando la tasa de transferencia durante la biodegradación y aumentando su resistencia a la degradación **(Kebede et al., 2021)**. Los aceites pesados presentan una escasa o nula dispersión en el agua debido a su alta viscosidad, lo que provoca una pobre biodisponibilidad del petróleo para los microorganismos degradadores **(Lin et al., 2022)**. Una de las principales estrategias de remediación ambiental para regenerar áreas contaminadas por hidrocarburos de petróleo es la biodegradación microbiana, la cual requiere una comprensión integral de los factores bióticos y abióticos que la regulan **(Liu et al., 2020)**.

Existen varios métodos de biodegradación en la naturaleza, mediante un proceso denominado atenuación natural, que depende de la capacidad de biodegradación que posean los microorganismos autóctonos para degradar y eliminar contaminantes del suelo **(Abena et al., 2019)**. Se ha demostrado que aislar e inocular estos tipos de bacterias degradantes mejora la eliminación de hidrocarburos de petróleo en sitios contaminados **(Liu et al., 2018)**. La importancia de conocer la interacción de los microorganismos autóctonos con los microorganismos exógenos, al tener presente que dicha actividad biológica se ve afectada por varios factores ambientales como las propiedades fisicoquímicas del suelo como pH, temperatura, humedad, nutrientes **(Varjani & Upasani, 2017)**. Además, de la presencia de comunidades microbianas específicas, lo que afectaría la eficiencia de la biorremediación **(Fan et al., 2020)**.

La biodisponibilidad de los contaminantes del suelo para los microorganismos implica procesos de adsorción y desorción, transporte y absorción por parte de los microorganismos **(Ren et al., 2018)**. De tal manera que los microorganismos deben entrar en una fase acuosa para que las bacterias logren degradarlos. Los hidrocarburos de petróleo son hidrófobos y se absorben en la matriz del suelo, lo que reduciría considerablemente su tasa de transferencia de masa **(Harms & Bosma, 1997)**. La mayoría de las fuentes de carbono de los suelos contaminados no se encontraban disponibles para los microorganismos, lo que limita la degradación de TPH (hidrocarburos totales de petróleo) **(Feng et al., 2021)**. Por lo tanto, lo que impide la degradación de hidrocarburos es la tardía desorción de estos compuestos de la fase sólida a la fase acuosa, lo que causa la baja bioaccesibilidad **(Qin et al., 2020)**. Además, los hidrocarburos de petróleo en el suelo pueden proporcionar grandes cantidades de fuentes de carbono disponibles para los microorganismos, sin embargo, la ausencia de nutrientes esenciales

para su desarrollo como el nitrógeno y el fósforo, limitarían su desarrollo, por esta razón varias investigaciones afirman que al proporcionar de dichos nutrientes al suelo contaminado, se podría promover la degradación de hidrocarburos (Hussain et al., 2018; Lindsey et al., 2018).

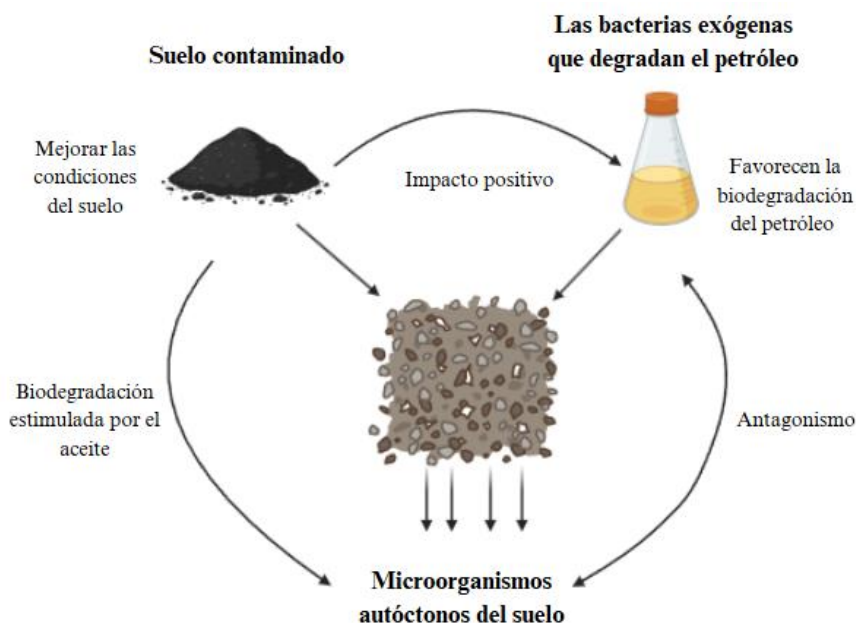


Figura 1. Proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. Adaptado de (Qin et al., 2020).

1.1.3. Fuente de microorganismos con capacidad de biorremediación

El suelo es la capa superficial de la corteza terrestre, formada por componentes minerales, orgánicos, gases y agua que rodea las partículas y llena los poros (González et al., 2021). Este suelo constituye la interfaz entre la tierra, el aire y el agua, lo que le permite cumplir funciones naturales y antropogénicas (Siebielec et al., 2023).

El suelo se clasifica según las proporciones de sus partículas, diferenciándose en limo, arcilla, arena y materia orgánica (MOS) en fracciones de alta y baja densidad (Ruehlmann & Körschens, 2020). Cada componente mineral y el humus se distribuyen formando pequeños poros que pueden contener sales minerales y nutrientes, creando un entorno propicio para las actividades metabólicas de los microorganismos (Yan et al., 2024). En el suelo se encuentran aproximadamente entre 10^5 y 10^9 bacterias cultivables por gramo, incluyendo hongos, actinomicetos, algas, protozoos y animales como los nematodos (Ayan et al., 2021). Aunque los hongos están presentes en menor proporción en unidades formadoras de colonias (UFC), representan una parte importante de la microbiota del suelo (Ayan et al., 2021). La formación de la estructura del suelo está influenciada por la interacción entre partículas

minerales y materia orgánica del suelo, y los productos obtenidos tras la descomposición microbiana para la estabilización de conexiones entre las partículas que inducen a la formación de agregados **(Bucka et al., 2021)**. Esto sugiere que en el suelo se puede encontrar una amplia variedad de poblaciones microbianas con diferentes capacidades metabólicas, y sus actividades están limitadas por las fuentes de carbono y energía disponibles **(Ortiz et al., 2021)**. Además, estas poblaciones microbianas están influenciadas por las características fisicoquímicas de cada tipo de suelo **(Ortiz et al., 2021)**.

Algunas de las poblaciones microbianas más abundantes en el suelo de labranza *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, cianobacterias, microorganismos solubilizadores de fósforo y potasio, y micorrizas **(Bhattarai et al., 2015)**. Asimismo, existen microorganismos con capacidad para biodegradar o reducir hidrocarburos del petróleo, contribuyendo a la biorremediación **(Roy et al., 2018)**. Entre estos se encuentran especies como *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium*, *Bacillus* sp., *Aeromonas* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Vibrio* sp., *Xanthomonas* sp. y *Pseudomonas* sp. **(Aziz et al., 2024)**. Esta última, la *P. aeruginosa* posee la capacidad de degradar una amplia gama de hidrocarburos derivados del petróleo, haciendo que la misma sea considerado un agente importante para la biorremediación de petróleo crudo y sus derivados **(Suwardi et al., 2021)**. Esta degradación involucra varias vías metabólicas. Para la degradación de n-alcanos, se lleva a cabo mediante una vía de oxidación terminal, a diferencia de las vías de salicilato y ftalato se utilizan para la degradación de HAP como el fluoreno **(Medić et al., 2020)**. Del mismo modo, la presencia de genes como *alkB* y *rhlAB* en cepas de *P. aeruginosa* permite la fácil descomposición de hidrocarburos alifáticos y la producción de biosurfactantes **(Stancu, 2022)**.

Los factores ambientales juegan un rol fundamental en el proceso de biodegradación. Mediante lo planteado por **Wang et al. (2021)**, el estrés inducido por la temperatura puede impedir la expresión de proteínas involucradas en la quimiotaxis, la emulsificación y la oxidación terminal de hidrocarburos. Por lo tanto, tener condiciones de temperatura óptima favorecen la actividad metabólica de *P. aeruginosa* y garantiza una degradación eficiente de los hidrocarburos.

La producción de biosurfactantes producidos específicamente por *P. aeruginosa* se conocen como ramnolípidos, mejoran la emulsificación y solubilización de hidrocarburos hidrófobos, lo que facilita su biodegradación **(Soberón-Chávez et al., 2021)**. Por ejemplo, la *P. aeruginosa* MF069166, logró producir ramnolípidos que redujeron significativamente la tensión superficial del agua y exhibieron una alta actividad de emulsificación en crudo de petróleo **(Rehman et al., 2021)**. Esta característica es fundamental debido a que permite mejorar la biodisponibilidad de los hidrocarburos para las bacterias degradantes **(Ibrar & Zhang, 2020)**.

Por otra parte, la capacidad metabólica de las poblaciones microbianas depende de las propiedades del suelo al que están adaptadas. En suelos con contaminación periódica, las poblaciones microbianas nativas se seleccionan en función de su capacidad para metabolizar el contaminante **(Uyar & Özgür, 2021)**. La biorremediación ha demostrado ser una alternativa económicamente viable para restaurar lugares contaminados **(Sales da Silva et al., 2020)**. Este proceso puede biodegradar una amplia gama de contaminantes mediante remediación biológica in situ (en el mismo lugar) o ex situ (en otro lugar). Sin embargo, su eficacia depende de las condiciones ambientales, el tipo de contaminante, la composición del suelo, los costos de eliminación y el tiempo disponible para la acción **(Kumar et al., 2018)**.

El suelo contaminado puede contener una mezcla de hidrocarburos cuya biodegradabilidad requiere ciertos factores: la presencia de una población de microorganismos capaces de degradar estos hidrocarburos, la estructura molecular del contaminante, su biodisponibilidad y concentración **(Vizuite et al., 2020)**. Además, se deben tener en cuenta las condiciones de pH, temperatura, humedad del suelo, aceptores de electrones y la presencia de nutrientes inorgánicos como nitrógeno y fósforo **(Kończak et al., 2023)**. Cada cepa bacteriana tiene diferentes requerimientos en términos de temperatura, pH y salinidad **(Vizuite et al., 2020)**. Según **Ñústez et al. (2014)**, una mayor diversidad de microorganismos aumenta el rango de tolerancia, aunque los rangos óptimos para la biodegradación son un pH entre 6 y 8, a una temperatura de 18 a 30 °C.

1.1.4. Biosurfactantes en la biorremediación de los suelos

Los agentes tensoactivos como los surfactantes son compuestos orgánicos de dos partes químicas con disímiles polaridades, su estructura consta de una cabeza polar y una cola no polar **(Shaban et al., 2020)**. Por lo tanto, los surfactantes se utilizan ampliamente para reducir la tensión superficial e interfacial entre dos o más fases **(Zhang et al., 2019)**. Los surfactantes se han utilizado ampliamente en sin número de productos industriales, como detergentes, medicamentos y tratamientos anticorrosivos. Además los surfactantes han contribuido a campos de investigación como es el caso de la nanotecnología **(Drummond & Fong, 1999; Wang et al., 2018; Zhao et al., 2018)**.

Las propiedades tensoactivas de un surfactante permiten reducir la tensión superficial (aire/agua) y estabilizando el sistema (por ejemplo, una emulsión o una espuma). A partir de una determinada concentración, la concentración micelar crítica (CMC) **(Johnson et al., 2021a)**, el incremento de dicha concentración de tensoactivo no reduce la tensión superficial **(Berg, 2010)**, por el contrario, por arriba de la CMC, las moléculas de tensoactivo se agregan en la fase principal, proceso denominado micelización, lo que se basa en la formación de micelas de diferente forma, que pueden

ser esféricas, de barra o de disco, dichas morfologías influyen en las propiedades reológicas y dinámicas de la solución de un tensoactivo (**Fletcher, 1996**); además, esto puede influenciar el rendimiento funcional del tensoactivo.

Los tensoactivos se pueden clasificar en función de la carga de la cabeza hidrófila de la molécula: catiónicos poseen carga positiva, aniónicos poseen carga negativa, anfóteros que constan de iones positivos y negativos y los no iónicos los cuales no poseen carga (**Ivanković & Hrenović, 2010**). Por lo tanto, su carácter determina las aplicaciones para las que son óptimas cada una, por ejemplo, los tensoactivos aniónicos se utilizan para sintetizar detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS) mejora la eficiencia de las metodologías de remediación al funcionar como extractante, emulsionante y dispersante (**Zhu et al., 2024**). Asimismo, los tensoactivos catiónicos se utilizan en productos como acondicionadores de cabello y suavizante de ropa, al poseer una interacción superficial bastante fuerte lo que provoca que las moléculas absorbidas alteran la textura de la superficie lo que les brinda suavidad (**Arai et al., 2001**). Además, estos tensoactivos tienen características antimicrobianas, y se utilizan para mejorar productos de aseo y antibióticos (**Cross & Singer, 2019**). Los tensoactivos aniónicos en la industria cosmética, farmacéutica y en la eliminación de hidrocarburos en los suelos (**Ivanković & Hrenović, 2010; Peters et al., 2009**). Los anfóteros presentan carga cambiante con el pH de catiónica a aniónica, lo que permite utilizarlos en varias aplicaciones en función del ambiente (**Ivanković & Hrenović, 2010**). Finalmente, los no iónicos se emplean en productos emulsificantes, agentes humectantes y agentes estabilizadores, que para incrementar su capacidad de eliminar suciedad de la superficie se mezcla con un componente iónico (**Ivanković & Hrenović, 2010**).

A partir de informes proporcionados por **Petterson et al. (2000)**, la producción de tensoactivos anteriormente era de 7 millones de toneladas anuales hace un poco más de 2 décadas, misma cifra que ha seguido incrementando hasta 14,1 millones en 2017, además, que para el 2022 existirá una producción de casi el 18% (**Chen et al., 2020**). Actualmente se cree que este crecimiento está subestimado, debido a la demanda real de productos que contengan tensoactivos debido a la pandemia del Covid-19, lo que representó en 2023, el mercado mundial USD 43,2 mil millones y se estima una proyección anual de 5,3% entre 2024 y 2030 (**Research, 2024**). El desarrollo de este tipo de componentes es abismal, debido a que su uso empieza desde hogares hasta industrial todos los días.

Sin embargo, la utilización de este tipo de sustancias genera un impacto ambiental bastante agresivo, mediante lo aportado por **Pradhan & Bhattacharyya (2017)**, casi el 60% en peso de los surfactantes se liberan al medio acuático, lo que equivaldría a 7 millones de toneladas a nivel mundial, provenientes de lixiviados en vertederos, derrames, fugas industriales y mediante el sistema de tratamiento de aguas (**Lapworth et al., 2011**).

La falta de biodegradabilidad de los surfactantes sintéticos hace que sean persistentes en el medio ambiente, además de que estas sustancias ayudan a la propagación de otros contaminantes como los metales pesados, que a su vez provocan problemas adicionales al ecosistema **(McDonnell & Russell, 1999)**. Del mismo modo, induce efectos sobre los ecosistemas acuáticos, por ende, a los microorganismos presentes en dichos lugares alterando sus funciones biológicas; que se ven mayormente afectados por altas concentraciones de surfactantes **(Cserhádi et al., 2002; Ivanković & Hrenović, 2010)**. Además, de los efectos nocivos presentados en flora y fauna; en la flora ya que se utilizan aguas grises en cultivos por su bajo costo y poco desperdicio de agua, según **Bubenheim et al. (1997)**, menciona que estas aguas existen restos de surfactantes los cuales causaban toxicidad alta en vegetales como la lechuga. Del mismo modo en la fauna ya que los peces y mariscos se ven afectados negativamente por los surfactantes sintéticos, debido a que provoca una destrucción total de las capas mucosas externas y en branquias, que tiene como función proteger a los peces de ataques de bacterias y parásitos, al no contar con dichas capas estos quedan expuestos y susceptibles a infecciones **(Effendi et al., 2017)**. Según lo mencionado por **Effendi et al. (2017)**, la tasa de mortalidad de los peces superó el 50% con concentraciones de detergentes alrededor de 15 ppm; los huevos de los peces morían con concentraciones de solo 5 ppm.

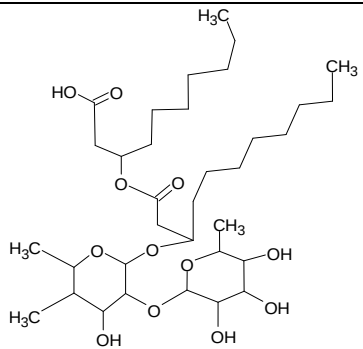
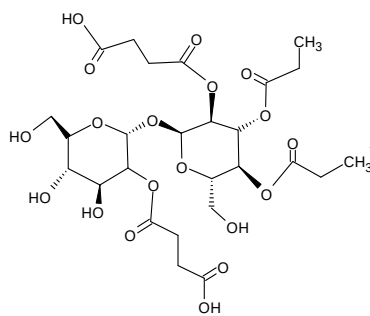
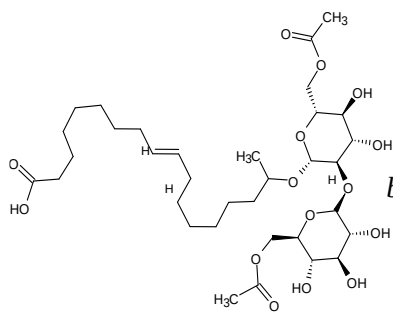
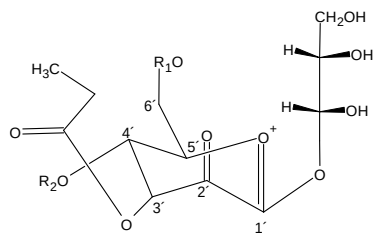
Por el contrario, los biosurfactantes son materiales tensoactivos anfifílicos que son abundantes en la naturaleza y son sintetizados por plantas, animales y microorganismos como bacterias y hongos **(Kitamoto et al., 2009; Pradhan & Bhattacharyya, 2017)**. A partir de lo mencionado por varios autores los biosurfactantes son producidos por microorganismos como bacterias, levaduras y hongos, desempeñan funciones fisiológicas como la motilidad, cambios en la hidrofobicidad de la membrana celular, y la formación y conservación de biofilms **(López et al., 2022; Patowary et al., 2017)**. Estos compuestos anfifílicos reducen la tensión superficial e interfacial, mejorando la emulsificación, espumación, humectación y dispersión **(Olasanmi & Thring, 2018)**. Los biosurfactantes poseen gran variedad de estructuras químicas debido a diversas vías biosintéticas, ofrecen una mayor versatilidad funcional, como lípidos polares (de origen animal y vegetal), ésteres de ácidos grasos de azúcares **(Holmberg, 2001)**, posee una cabeza hidrófila y cola hidrófoba que permite su actividad superficial **(Akbari et al., 2018)**. Casi todos los biosurfactantes son de tipo aniónico o no aniónico **(Bognolo, 1999)**, se dividen en moléculas de baja masa molecular (650- 1126,4 g/mol) y polímeros de alta masa molecular (>45000 g/mol) **(Banat et al., 2000; Jahan et al., 2020; Marchant & Banat, 2012)**.

Algunos ejemplos de biosurfactantes son los ramnolípidos y soforolípidos que pueden reducir la tensión superficial del agua a 26mN m⁻¹ y 33 mN m⁻¹, respectivamente **(Soberón-Chávez et al., 2021)**, bastante similar con el resultado obtenido con el surfactante sintético SDS 25 mN m⁻¹. Los biosurfactantes son de mayor tamaño y tienen varias cadenas ramificadas, de este modo, el número máximo adsorbido en la interfaz (de la CMC) es menor para compuestos más pequeños **(Johnson et al.,**

2021). Los ramnolípidos tienen valores de CMC en un rango de 10-20 mg/L, bastante menor que el SDS. Cabe mencionar, que las propiedades precisas de los biosurfactantes dependen del entorno de crecimiento del microorganismo del cual fue obtenido (**Long et al., 2017**). Los biosurfactantes tienen estructuras diferentes, resultado de su variada funcionalidad y origen (**Tabla 1**).

Tabla 1.

Clasificación de biosurfactantes según el microorganismo de origen.

Clasificación	Estructura química	Microorganismo	Tensión superficial en CMC	Referencias
Ramnolípido		<i>P. aeruginosa</i>	29 mN m ⁻¹	(Kopalle et al., 2022).
Trehalolípido		<i>Rhodococcus erythropolis</i>	29 mN m ⁻¹	(Shao, 2011).
Soforolípidos		<i>Candida bombicola</i>	33 mN m ⁻¹	(Patel et al., 2023)
Lípidos de manosileritritol		<i>Candida antartica</i>	28 mN m ⁻¹	(Coelho et al., 2020)

Nota: Indica la clasificación de los biosurfactantes producidos por microorganismos con su estructura química y su Concentración Micelar Crítica (CMC) Adaptado de **Johnson et al. (2021)**.

Los biosurfactantes se están investigando en la actualidad como un reemplazo de los surfactantes de origen sintético en varias industrias, incluidas la producción de petróleo, la remediación ambiental, la limpieza industrial, los alimentos, el cuidado personal y la industria farmacéutica (**Johnson et al., 2021**). Se concuerda con **Jahan et al. (2020)**, ya que menciona que se utilizan ampliamente en detergentes, petróleo, medio ambiente, agricultura, cosméticos y alimentación. Además, presentan baja toxicidad, alta biodegradabilidad, biocompatibilidad y pueden obtenerse de fuentes baratas y sostenibles, como desechos industriales (**Fenibo et al., 2019; Klimek et al., 2024**). De tal manera dispone de un amplio rango de estabilidad a temperaturas y pH, debido a la abundancia de sus fuentes naturales, adaptabilidad y actividad antimicrobiana (**Mulligan et al., 2014**).

La utilización de biosurfactantes para mejorar y apresurar los procesos de biorremediación ha sido reportado ampliamente por **Bjerk et al., (2021)**. Un claro ejemplo es la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos al permitir su desorción y la eliminación de contaminantes de metales pesados (**Benincasa et al., 2004**), haciendo que el contaminante se una a los biosurfactantes y admitir su transporte fuera del suelo contaminado (**Mulligan et al., 2001**). Mediante un estudio comparativo de la remediación del suelo con surfactantes y biosurfactantes realizado por **Wang & Mulligan (2004)**, han demostrado que una concentración ínfima del 0,5% del biosurfactante ramnolípido (en agua) fue capaz de eliminar el 61,7% de metales pesados como el Cadmio y del Níquel el 51%, al contrario, al utilizar surfactantes de origen sintético usando la misma concentración de Tritón X-100 se eliminó solo el 52,8% y el 45,2% de Cadmio y Níquel, respectivamente. Es así, que los surfactantes sintéticos no son tan eficaces como los biosurfactantes. Promueven la fluidización del petróleo en el suelo, facilitando su biodegradación por microorganismos (**Adetunji & Oufolahan, 2021**). Estas biomoléculas son una solución eficaz y ecológica para mejorar los procesos de remediación ambiental (**Satpute et al., 2016**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general:

Efectuar una bioprospección de microorganismos autóctonos productores de biosurfactantes aislados de suelos contaminados con aceites de lubricadoras en Ambato.

1.2.2. Objetivos específicos:

- Aislar cepas bacterianas con potencial de producción de biosurfactantes a partir de suelos contaminados con aceites usados de lubricadoras en Ambato.
- Caracterizar las cepas productoras de biosurfactantes mediante ensayos fenotípicos, pruebas bioquímicas e identificación molecular.
- Evaluar la capacidad de biodegradación de las cepas seleccionadas sobre aceite mediante análisis gravimétrico.

2. CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1. Materiales

Tabla 2

Materiales necesarios para el desarrollo del proyecto de titulación.

Material	Cantidad
Reactivos	
Plate count agar (PCA)	50 g
Agua destilada	10 L
Etanol 96%	1,5 L
Etanol 70%	4 L
Glicerol (GLY)	25 mL
Luria Bertani (LB)	60 g
Mueller Hilton Agar (MHE)	60 g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	4 g
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	4 g
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	9 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	9 g
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	9 g
Nitrato de sodio (NaNO ₃)	6,5 g
Percloruro férrico (FeCl ₃)	0,75 g
Cloruro de sodio (NaCl)	20 g
Ácido Clorhídrico (HCl)	100 mL
Acetato de Etilo	100 mL
Éter de petróleo	340 mL
Extracto de levadura	1,5 g
Triptona	2 g
Tris	6,5 g
Colorante liposoluble	1 oz
Aceite comestible	500 mL
Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB)	0,15 g
Azul de Metileno	
Agar- Agar	0,005 g
	50 g

Material fungible	
Puntas de 100 – 1000 µL	2 racks
Puntas de 200 µL	1 rack
Asas de siembra	2
Asa de Drigalsky	1
Cajas Petri desechables	250
Tubos Eppendorf	30
Micropipeta (1000 µL)	1
Micropipeta (100 µL)	1
Espátula	1
Tubo de ensayo	45
Pipetas Graduada de Vidrio de 10 mL	1
Pera de succión	1
Gradilla	1
Filtro de Membrana de Microdisco de 0.22 µm	12
Frascos de Tapa Azul (500 mL)	9
Frascos de Tapa Azul (100 mL)	6
Frascos de Tapa Azul (1000 mL)	2
Equipos	
Autoclave	1
Balanza analítica	1
Cabina de flujo laminar bioseguridad 2	1
Centrífuga	1
Vortex	1
Nevera (4°C)	1
Ultracongelador (-80°C)	1
Potenciómetro	1
Micropipeta (0.5 – 10 µL)	1
Micropipeta (100 – 1000 µL)	1
Incubadora (35 °C)	1
Estufa (50 °C)	1
Centrífuga	1
Mechero Bunsen	1
Campana de extracción	1

Tabla 3.

Insumos y materiales de escritorio.

Material	Cantidad
Cofias	1
Mascarillas	1 caja x 50 unidades
Guantes	1 caja x 50 unidades
Cinta testigo de esterilización	1/8 de rollo
Cinta de adhesiva	1 rollo
Cinta para etiquetar	1 rollo
Papel aluminio	1 rollo
Papel industrial	1 rollo
Tijera	1
Rotulador doble punta	1
Jabón líquido para platos	1L
Alcohol antiséptico	1L
Jabón líquido	500 mL
Cloro	1 L
Fósforos	1 caja
Computadora	1
Esferos	1
Cuaderno cosido	1

2.2. Métodos

2.2.1. Aislamiento y purificación de cepas bacterianas con capacidad de producción de biosurfactantes.

El aislamiento se realizó en base a la metodología establecida por **Patowary et al. (2017)**, con ligeras modificaciones. En este procedimiento se utilizó como medio de cultivo el medio mineral BH (Bushnell Hass Broth) cuya composición por litro de agua destilada es sulfato de magnesio 0,2 g, cloruro de calcio 0,02 g, fosfato monopotásico 1 g, fosfato dipotásico 1 g, nitrato de amonio 1 g y percloruro férrico 0,05 g. Se inocularon en el medio BH con 1 g de suelo contaminado con hidrocarburos enriqueciéndolo con el lubricante usado estéril 2% (v/v) como única fuente de carbono, del mismo modo el pH se ajustará a un rango de $7,0 \pm 0,2$. Se dejó en agitación constante por un periodo de 7 días a temperatura ambiente. Después de estos 7 días, se agregaron 1 mL del inóculo a 100 mL de BH y se incubaron nuevamente en condiciones similares durante otros 7 días para disminuir la carga microbiana no deseada, lo que se llevó a cabo hasta completar cuatro resiembras totales. Luego, se utilizó 1 mL del medio de cultivo para una dilución seriada, donde se sembraron por expansión las diluciones desde la -4 hasta la -6 , en placas de PCA (Plate count agar) y se incubaron a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Después, se seleccionaron colonias bacterianas de diferente morfología y se sembraron por separado con el fin de obtener un cultivo puro de los aislados bacterianos.

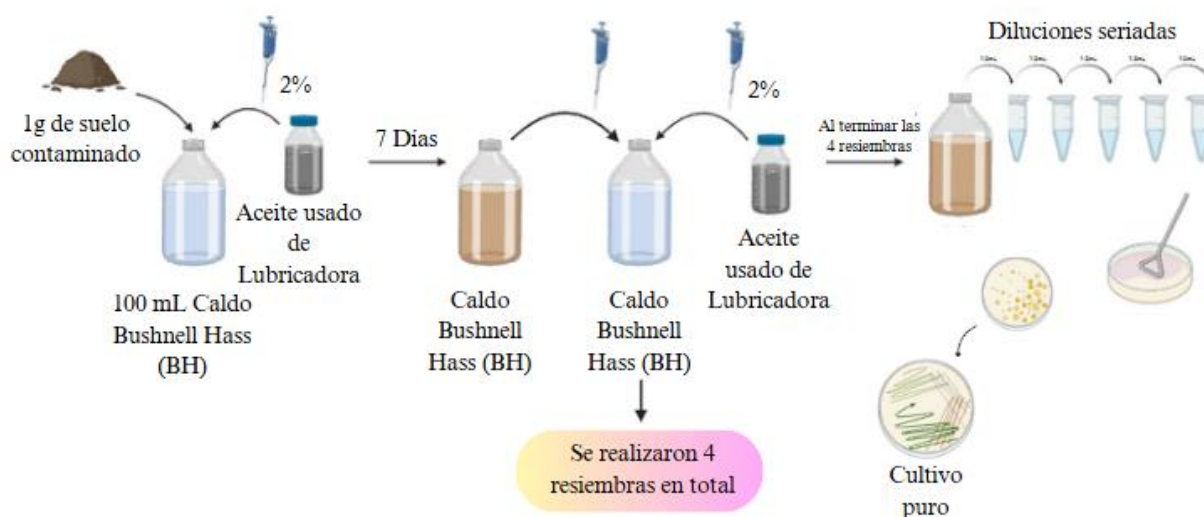


Figura 2. Preparación del medio de cultivo Bushnell Hass para obtener un cultivo puro después de 7 días de incubación.

Nota: Se realizaron un total de cuatro resiembras.

2.2.2. Criopreservación y recuperación de aislamientos bacterianos

Para criopreservar y mantener viables las cepas aisladas se realizó el siguiente protocolo: se tomaron 300 μL de glicerol en un tubo Eppendorf, donde, se colocó 700 μL de TBS (Tryptic Soy Broth), finalmente se tomó con un asa de siembra, colonias aisladas de bacteria y se introdujo en el medio líquido para luego agitar la mezcla con un vortex. Se rotularon los tubos con una codificación específica y se almacenaron en un ultracongelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este protocolo sigue las recomendaciones de **Aulet de Saab et al. (2001)**, quien menciona que realizar una criopreservación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ suplementado con un crioprotector en este caso el glicerol, permite la recuperación de la bacteria luego de 12 meses de almacenamiento.

Después, para la recuperación de estas cepas bacterianas, se descongeló la muestra para luego agitarla en el vortex. Se tomaron con el asa de siembra para su posterior sembrado en placa con agar PCA, con el fin de verificar que se trate de un cultivo puro que se comprobó con el crecimiento de una sola morfología (**Rani et al., 2020**). Al tener un cultivo puro se generó biomasa en medio líquido HB con ligeras modificaciones: KH_2PO_4 0,68 g, Na_2HPO_4 4,5 g, MgSO_4 4.7 g, H_2O 0,1 g, glicerol 30 g, NaNO_3 6,5 g y extracto de levadura 0,5 g para 1L de agua destilada (**George & Jayachandran, 2009**); en un tubo de ensayo por un lapso de 9seish lo que se realizó con cada una de las cepas identificadas y que se verificó con la presencia de turbiedad. Finalmente, se centrifugó por 4 min a 8000 rpm para obtener un sobrenadante libre de células, que luego se filtró con ayuda de una jeringa y un filtro de 0,22 μm (**Rani et al., 2020**).

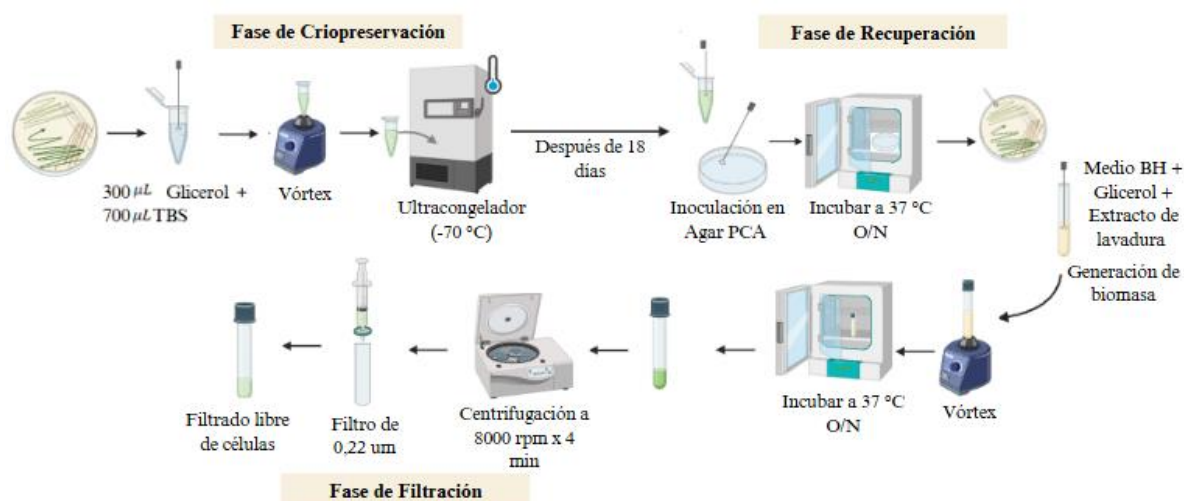


Figura 3. Las fases de realización necesarias para llegar a realizar los filtrados de los aislados bacterianos.

2.2.3. Actividad hemolítica

Para la realización del ensayo de la actividad hemolítica se requirió de placas de agar sangre con 5% (v/v) de sangre de cordero con la siguiente composición: NaCl 10 g, levadura 5 g, triptona 10 g, y agar 15 g en 1 L de agua destilada (**Phan et al., 2013**). Se realizó es un estriado con cada uno de los filtrados obtenidos anteriormente. Se logró observar una zona de aclaramiento alrededor de la colonia bacteriana, lo que indicó la secreción de biosurfactantes del tipo glucolípido por la actividad de hemólisis (**Rani et al., 2020**).

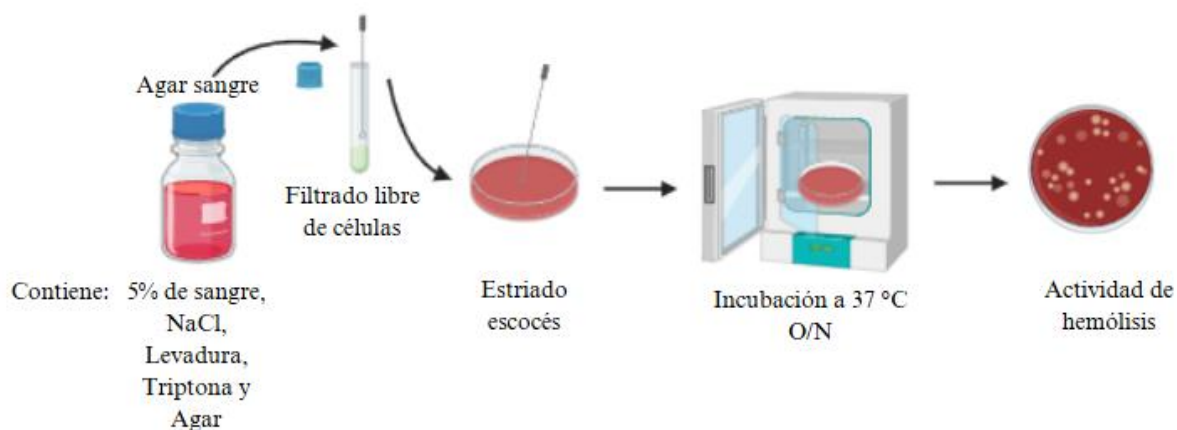


Figura 4. Evaluación de la actividad de hemólisis realizada con los filtrados libres de células.

2.2.4. Ensayo del colapso de la gota por caída

Para este ensayo se siguió la metodología planteada por **Samsu et al. (2020)**, con ligeras modificaciones. En primer lugar, se colocó una sola gota de aceite lubricante usado ($5\ \mu\text{L}$) en un portaobjetos de vidrio, después se dejó caer una sola gota del cultivo bacteriano filtrado ($2\ \mu\text{L}$) sobre la gota de aceite lubricante usado y se observó la actividad de colapso de gota. Lo mismo se realizó con aceite de cocina con colorante. Donde, se usó como control negativo al agua destilada y como control positivo jabón en agua por su actividad surfactante. Finalmente, se registró un resultado positivo cuando la gota sea plana sobre el aceite, por el contrario, se considerará un resultado negativo cuando la gota del filtrado no sea plana.

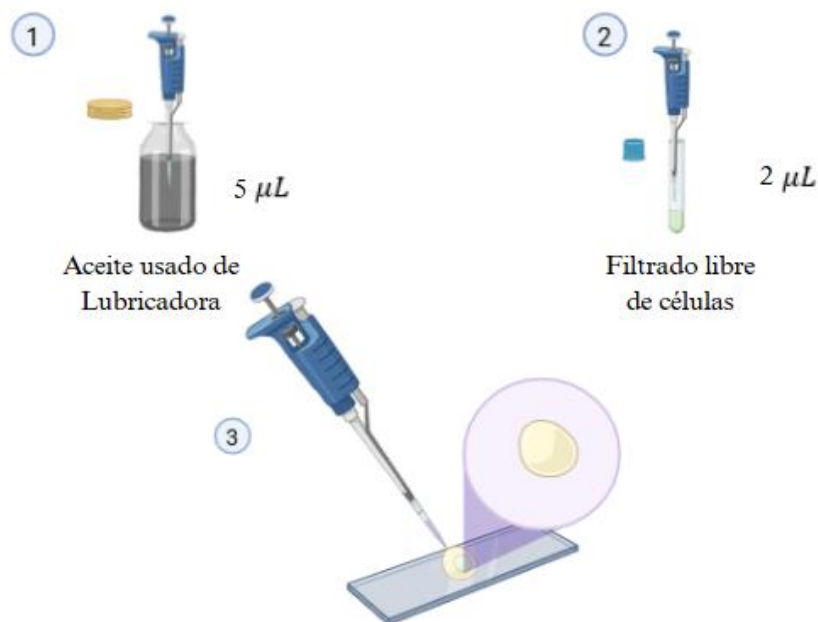


Figura 5. Ensayo del colapso de la gota realizada con los filtrados libres de células.

Nota: Seguir estos pasos fueron fundamentales para poder observar el colapso de la gota por caída.

2.2.5. Ensayo de emulsificación

Para este ensayo se siguió la metodología de **Rani et al. (2020)**, con ligeras modificaciones, en primer lugar, se añadió un volumen de 1 mL del sobrenadante libre de células a 5 mL de tampón Tris 50 mM a un pH de 8 en un tubo de ensayo, después se añadió aceite con colorante ($5\ \mu\text{L}$) a ambas capas y se agitó durante 1 minuto en un vortex, luego se dejó reposar la emulsión durante 20 minutos. Después, se tomó un volumen de 3 mL de cada emulsión y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro con una densidad óptica de 610 nm (**Muthezhilan et al., 2014**). El control negativo consistió en la solución tampón, mientras que para el control positivo se utilizó aceite con colorante con Tween 80.

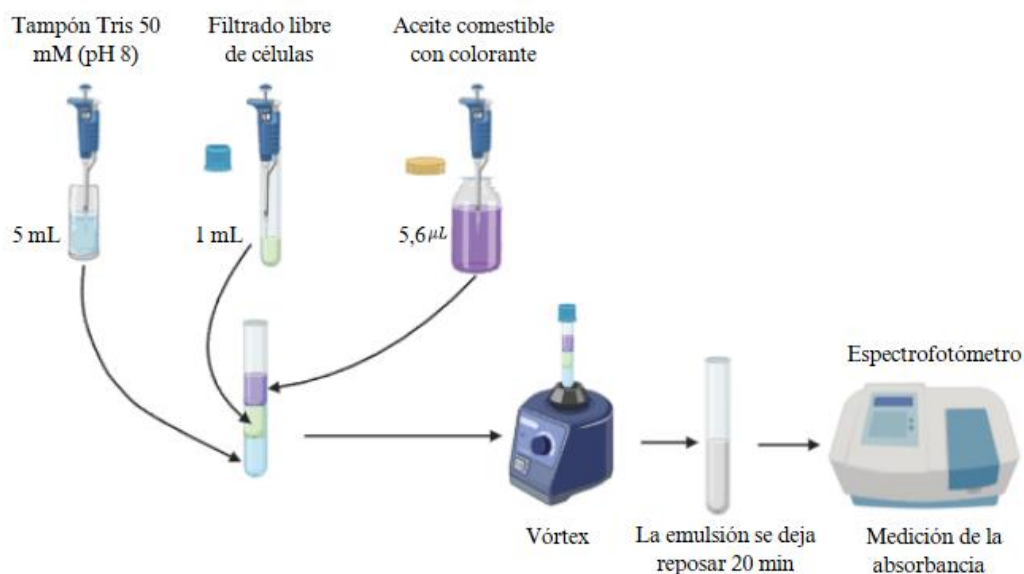


Figura 6. Ensayo de emulsificación realizada con los filtrados libres de células.

Nota: La longitud de onda utilizada fue de 610 nm.

2.2.6. Ensayo de agar CTAB

En primera instancia se realizaron placas de agar CTAB añadiendo 0,15 g de Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB), 0,005 g de azul de metileno y 12 g de agar para 1L de agua destilada, ajustando su pH a 7 (**Tahzibi et al., 2004**). Luego, se realizaron dos orificios en las placas de CTAB y se colocaron 150 μL del filtrado libre de células dentro de cada orificio. Finalmente, las placas se llevaron a incubación a 37 °C durante 48 h. El sobrenadante libre de células contenía surfactante aniónico lo que hizo que se produzcan halos en los pocillos donde se colocaron los filtrados (**Rani et al., 2020**).

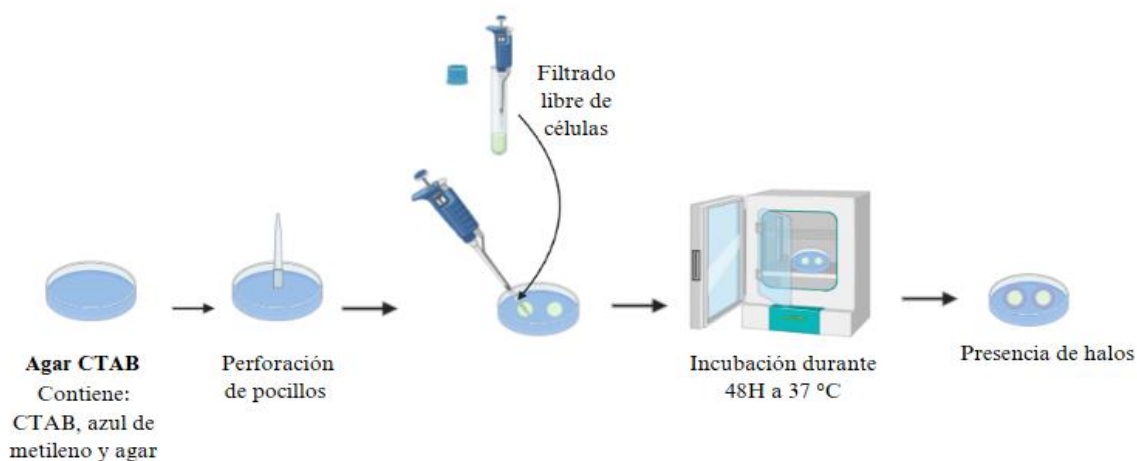


Figura 7. Ensayo del agar CTAB realizada con los filtrados libres de células.

Nota: La presencia de halos de color violeta representa la presencia de biosurfactantes.

2.2.7. Ensayo de propagación de aceite

Para llevar a cabo este ensayo se realizó lo planteado por **Ibrahim et al. (2013)**, con ligeras modificaciones. Se colocaron 10 mL de agua destilada en una caja Petri y luego se colocaron 10 μL de aceite. Después, se colocó una gota de sobrenadante filtrado (20 μL) sobre el centro de la capa de aceite, a continuación, se midió el diámetro de la zona transparente en la superficie de la capa de aceite y se comparó con el control tanto positivo como negativo (**Rani et al., 2020**).

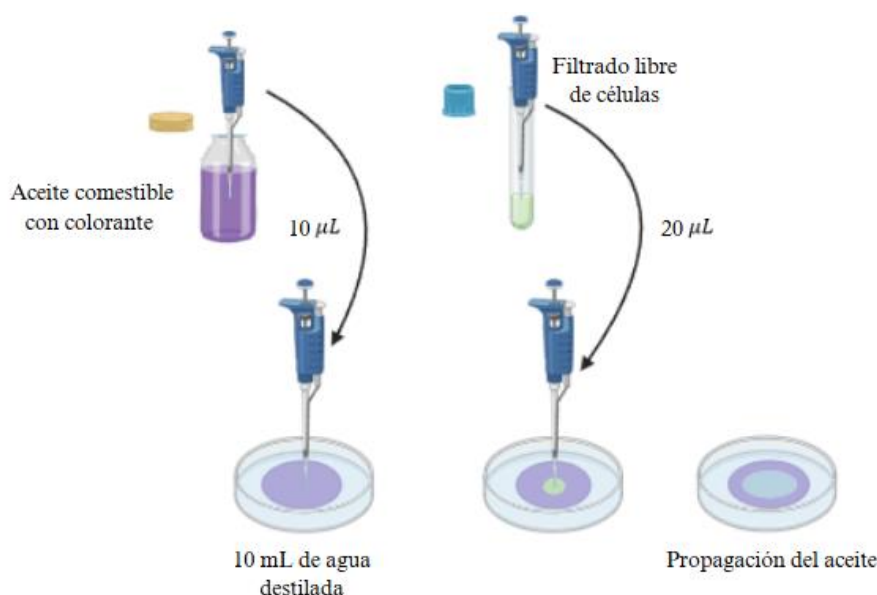


Figura 8. Ensayo de la propagación del aceite con los filtrados libres de células.

2.2.8. Identificación de cepas bacterianas mediante MALDI-TOF

Las bacterias que posean alta capacidad de producción de biosurfactantes, se analizaron a través de la tecnología de espectrometría de desorción láser por la matriz con detección de masa por tiempo de vuelo (MALDI-TOF, del inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) en base a una colaboración con la Universidad Central del Ecuador. Según **Singhal et al. (2015)**, la muestra para el análisis por MALDI MS se preparó mezclándola con una solución de un compuesto orgánico absorbente de energía, denominado matriz. Al secarse, esta cristaliza, permitiendo que la muestra se ionice automáticamente con un rayo láser. Esto provoca que los iones protonados se aceleren a un potencial fijo, separándose en función de su relación masa-carga (m/z). Los analitos se miden y, con base en la información TOF, se genera un espectro llamado huella de masa de péptidos (PMF) para los analitos de la muestra. En la actualidad es utilizado en la identificación altamente específica y sensible de bacterias y levaduras a partir de muestras clínicas, que pueden incluir fluidos corporales estériles (**Azrad et al., 2019**).

2.2.9. Tipificación molecular por el Consenso Intergénico Repetitivo de Enterobacterias (ERIC) PCR

Para analizar la diversidad genética de los aislados bacterianos se realizó una reacción ERIC PCR. En la PCR se emplearon cebadores específicos (Primer forward 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' y primer reverse 5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). La amplificación se llevó a cabo con una desnaturalización inicial durante 5 min a 94 °C; 30 ciclos de desnaturalización de 30 s a 94 °C, hibridación de los cebadores por 30 s a 55 °C, extensión a 30 s a 72 °C; y extensión final de 10 min a 72 °C en termociclador. El producto amplificado resultante se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (Ramakrishnan et al., 2022).

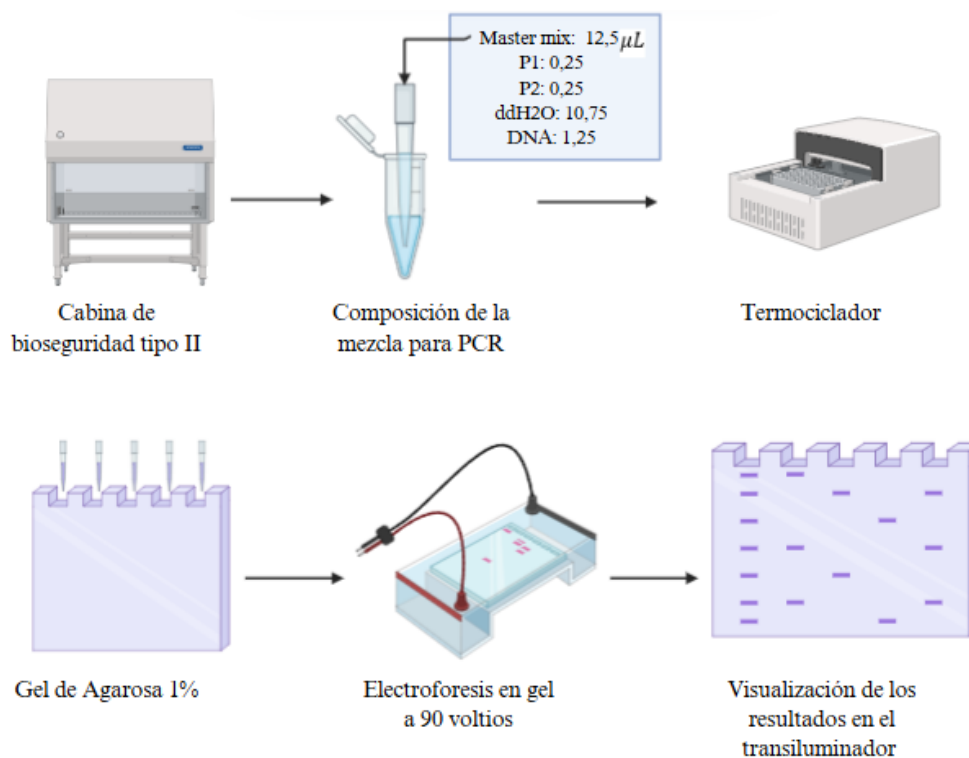


Figura 9. Protocolo de ERIC PCR y Electroforesis en gel de agarosa.

2.2.10. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en pocillos de agar

Para identificar la actividad antimicrobiana que poseen los biosurfactantes se seguirá la metodología planteada por Essghaier et al. (2021). Se utilizarán especies de bacterias gramnegativas (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) y bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*). Antes de su utilización se deberá diluir en agua destilada para ajustarlo a una concentración adecuada. Para las cepas antimicrobianas, se utilizó el medio Mueller- Hinton. Se transferirá por separado una suspensión celular de una noche (0,1 μ L) ajustada a 10⁷ UFC/ml a la superficie del agar. Después, se perforarán pocillos de seis mm en cada placa y se pipetearán asépticamente 30 μ L del complejo de

biosurfactante en cada pocillo. Luego, del paso de difusión que será dentro de 30 min a 4 °C, se incubaron las placas a 37 °C. Se observó zonas claras alrededor de cada pocillo lo que indicaron la presencia de la actividad antimicrobiana. Cabe mencionar que se utilizó ceftazidima CAZ30 como control positivo, mientras que el control negativo consistió en 30 μ L de agua destilada esterilizada.

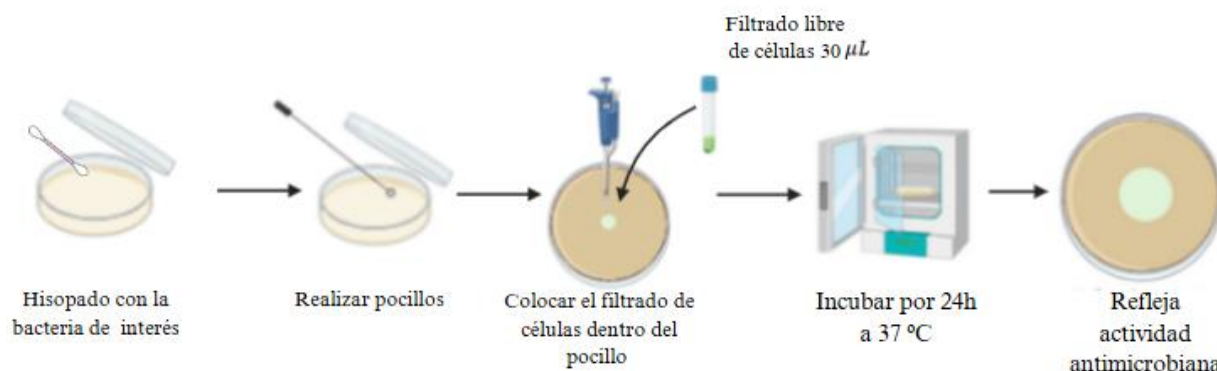


Figura 10. Indica la actividad antimicrobiana.

2.2.11. Evaluación de la capacidad de biodegradación de las cepas seleccionadas sobre aceite mediante análisis gravimétrico.

Este método es una adaptación del método **EPA (2000)**, para evaluar la biodegradación de aceite quemado en agua mediante gravimetría, utilizando una concentración inicial del 2% de aceite en 100 mL de muestra en cada unidad experimental, y una concentración bacteriana inicial de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL de cada bacteria productora de biosurfactantes, por separado y triplicado. Se utilizó un diseño experimental factorial $A \times B \times C$, donde: A corresponde al tiempo, B a los tipos de cepas bacterianas y C al medio de cultivo (con y sin sustrato adicional -sacarosa-). Se tomaron muestras a los 0, 7, y 14 días. Para proceder con el análisis de TPH (Hidrocarburos Totales de Petróleo) gravimétrico, se añadieron 20 mL de éter de petróleo a cada muestra en un embudo de separación, se agitó suavemente con el de objetivo de disolver los hidrocarburos en el disolvente, y se ventila periódicamente. Una vez que se formen dos fases, se eliminó la capa acuosa y se reserva la orgánica con los hidrocarburos extraídos. Este proceso de extracción se repitió dos veces más, donde, se agregaron 20 mL de éter de petróleo en cada ciclo para maximizar la recuperación. Las fracciones orgánicas se combinaron en un plato de evaporación pre-pesado y se evaporó el éter de petróleo dentro de una campana extractora o placa de calentamiento a baja temperatura hasta dejar solo el residuo de hidrocarburos, que luego se enfrió y se pesó en una balanza analítica. Finalmente, la masa de hidrocarburos extraídos se calcula restando el peso inicial del plato al peso final, lo cual permitió la evaluación de la eficiencia de biodegradación en cada muestra al compararse con la cantidad inicial de hidrocarburos, lo que ofreció así una medida precisa de la reducción de hidrocarburos debido a la biodegradación.

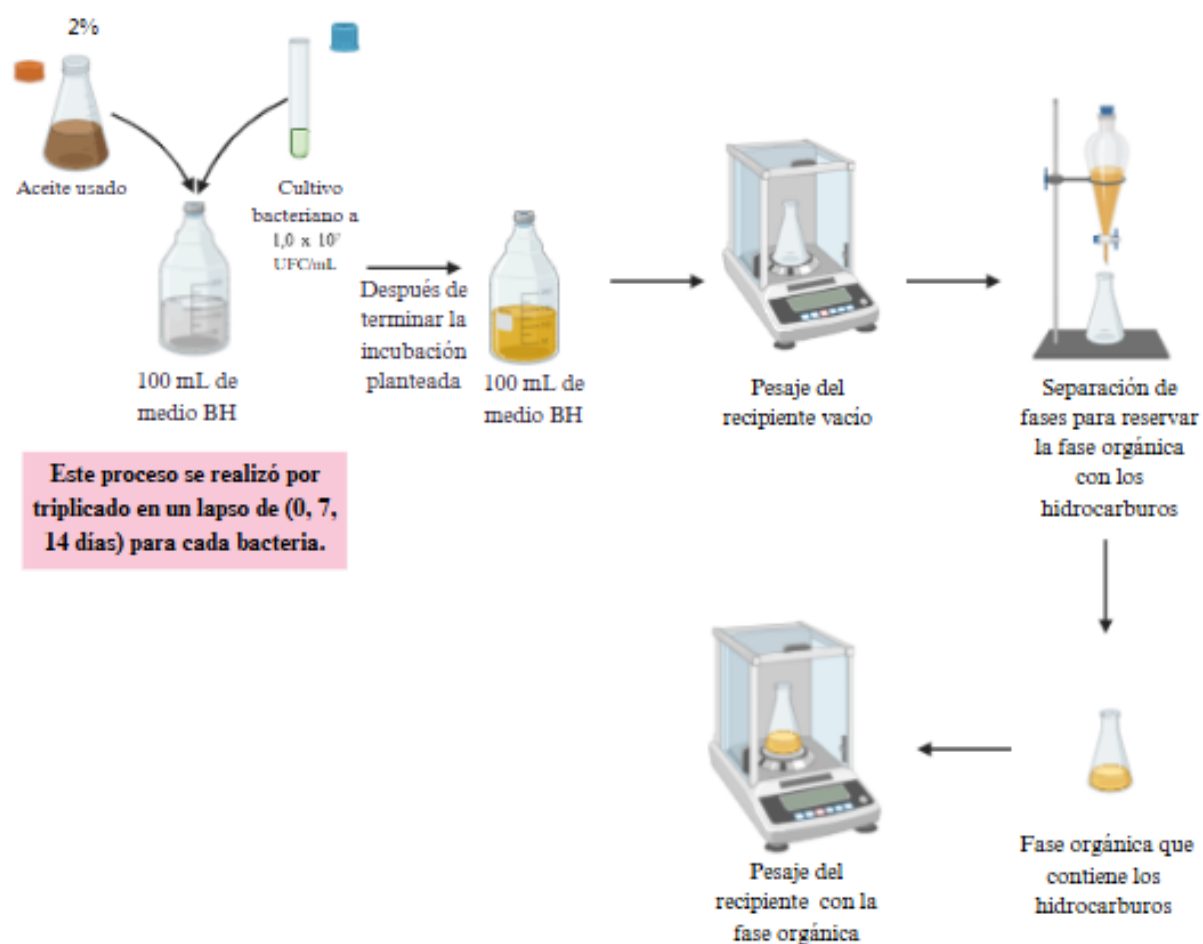


Figura 11. Proceso realizado para el análisis de la biodegradación del aceite.

3. CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados.

Las bacterias potencialmente productoras de biosurfactantes se aislaron a partir suelos contaminados con aceite lubricante usado de lubricadoras de Ambato, en el medio mineral BH suplementado con aceite de motor usado. La descripción de los sitios de muestreo se detalla en el Anexo 1. En este estudio, se obtuvieron y examinaron un total de 43 aislados bacterianos a partir de suelos contaminados con aceite de lubricadora. Posteriormente, se realizaron diversas pruebas para la identificación de aquellas capaces de producir biosurfactantes, como el colapso de gota por caída, emulsificación, actividad hemolítica, propagación del aceite y agar CTAB. La tabla 4 representa los resultados de las evaluaciones realizadas a la colección de aislamientos.

Tabla 4

Ensayos realizados para conocer a bacterias productoras de biosurfactantes.

Nro.	Codificación de Bacterias	Colapso de la gota por caída	Emulsificación (A _{610 nm})	Actividad hemolítica	Propagación del aceite	Agar CTAB
1	L L3 Verde	(+)	2,3181	(+) Beta	(+)	(+)
2	L L1 Verde	(+)	2,3226	(+) Beta	(+)	(+)
3	L CFV	(+)	1,9392	(+) Beta	(+)	(+)
4	M1 LR1 CAJ	(-)	0,2797	(-)	(-)	(-)
5	M2 Lab Solís B4	(-)	0,805	(-)	(-)	(-)
6	M2 Lab Solís B3	(-)	0,6159	(-)	(-)	(-)
7	M3 Rocío A3 CB	(-)	2,282	(-)	(-)	(-)
8	M2 Lab Solís B2	(-)	0,764	(-)	(-)	(-)
9	M3 L CFV	(+)	3,1654	(+) Beta	(+)	(+)
10	M3 R CBG	(-)	0,5963	(-)	(-)	(-)
11	A1 R M3 CB	(-)	0,5349	(-)	(-)	(-)
12	M2 R A2 CB	(-)	0,5777	(-)	(-)	(-)
13	M1 R P3 CB	(-)	0,2787	(-)	(-)	(-)
14	M2 R C1 CB	(-)	0,4575	(-)	(-)	(-)
15	M1 R P2 CB	(-)	0,3489	(-)	(-)	(-)
16	M2 R C2 CB	(-)	0,3437	(-)	(-)	(-)
17	M1 R P1 A1 CB	(-)	0,2887	(-)	(-)	(-)
18	M2 S CBeig	(-)	0,2879	(-)	(-)	(-)

Nro.	Codificación de Bacterias	Colapso de la gota por caída	Emulsificación (A _{610 nm})	Actividad hemolítica	Propagación del aceite	Agar CTAB
19	Lub S M1 Z1 CB	(-)	0,4215	(-)	(-)	(-)
20	Lub S M1 Z3 CBD	(-)	0,4106	(-)	(-)	(-)
21	Lub S M1 Z2 CB	(-)	0,3092	(-)	(-)	(-)
22	M2 Lub S Z3 CB	(-)	0,4681	(-)	(-)	(-)
23	Lub S B1	(-)	0,3405	(-)	(-)	(-)
24	M2 S VF	(-)	0,9507	(-)	(-)	(-)
25	Z CT	(-)	0,2107	(-)	(-)	(-)
26	Z CBJ2	(-)	0,461	(-)	(-)	(-)
27	Z CT2	(-)	0,2371	(-)	(-)	(-)
28	M3 LL2 CB	(-)	0,2089	(-)	(-)	(-)
29	M2 L CB	(-)	0,4113	(-)	(-)	(-)
30	CB M	(+)	0,295	(-)	(-)	(-)
31	CA M	(-)	0,2952	(-)	(-)	(-)
32	VBRR1	(+)	0,6429	(+) Beta	(+)	(+)
33	VBRR2	(+)	1,4567	(+) Beta	(+)	(+)
34	CT M	(-)	0,2141	(-)	(-)	(-)
35	IA E	(-)	0,294	(-)	(-)	(-)
36	CA E	(-)	0,375	(-)	(-)	(-)
37	CT E	(-)	0,5082	(-)	(-)	(-)
38	CAG E	(-)	0,588	(-)	(-)	(-)
39	CB C	(-)	0,3096	(-)	(-)	(-)
40	CA C	(-)	0,2181	(-)	(-)	(-)
41	CT C	(-)	0,118	(-)	(-)	(-)
42	CPC C	(-)	0,1763	(-)	(-)	(-)
43	CI C	(-)	0,4079	(-)	(-)	(-)

Nota. Esta tabla muestra seis cepas con la capacidad de producir biosurfactantes al mostrar un resultado positivo en los ensayos realizados de colapso de gota por caída, actividad hemolítica, emulsificación, propagación del aceite y el agar CTAB.

En el ensayo de colapso de la gota por caída, se identificaron seis aislamientos que mostraron resultados positivos, debido a que la visualización de la gota del filtrado sobre el aceite fue plana. A partir de lo sugerido por **Samsu et al. (2020)**, pudo deberse a una reducción de la tensión interfacial

entre el sobrenadante del cultivo y la gota del aceite, por una alteración en la estabilidad de la gota de aceite (**Tabla 6**).

En la prueba de la propagación del aceite, este efecto se puede observar con el aumento del diámetro de la gota de aceite al agregarse el sobrenadante libre de células, debido a que los biosurfactantes poseen propiedades anfipáticas, es decir, poseen una región hidrofílica y otra hidrofóbica, que al entrar en contacto con la gota de aceite, las moléculas del biosurfactante se alinean en la interfaz agua- aceite disminuyendo la tensión superficial e interfacial (**Becerra & Horna, 2016**); estas pruebas detectan la capacidad del tensoactivo de los aislados para reducir la tensión interfacial. En teoría, ambos ensayos tienen el mismo principio, por ende, los resultados deberían ser lineales entre sí lo que se puede observar (**Tabla 6**). De este modo, el biosurfactante producido por las cepas VBRR2 y L L3 Verde mostraron una mayor actividad superficial, el diámetro del círculo desplazado fue de 2,7 y 2,5 cm, respectivamente. Sin embargo, estos tardaron alrededor de 1 minuto para que se produzca dicho efecto, al contrario de la cepa M3 L CFV, donde el desplazamiento fue inmediato que puede deberse a una estabilización de la parte de aceite en el agua.

Por otro lado, en la prueba de actividad hemolítica se obtuvo resultados positivos con una hemólisis beta, debido a que existió una lisis completa de los glóbulos rojos como se ilustra en la **Tabla 6**. estas zonas hemolíticas se relacionaron con la capacidad de estas cepas para producir biosurfactantes (**Carrillo et al., 1996**). Además, la hemólisis de los biosurfactantes puede deberse a que las moléculas de biosurfactantes y las bicapas de fosfolípidos en las membranas celulares forman micelas mixtas, lo que da como resultado la fractura de las membranas celulares (**Vinardell & Infante, 1999**). De esta forma, cuanto más fuerte es la hemólisis, mayor es la actividad superficial de los biosurfactantes (**Sun et al., 2018**). Sin embargo, este método no es tan específico debido a que las zonas de aclaramiento también podrían indicar la presencia de enzimas líticas que pueden ser producidas por los microorganismos (**Haytham, 2018**); por lo tanto, se han implementado ensayos adicionales para confirmar la producción de biosurfactantes.

La actividad emulsificante es una propiedad fundamental para conocer el rendimiento de los biosurfactantes, dieron valores por encima de 0,600 en la medición de absorbancia, lo que puede indicar que la emulsión formada entre el aceite y el agua es más estable, reflejaría una mayor capacidad emulsificante, debido a que existen más partículas de aceite en suspensión por acción del biosurfactante (**Tavares et al., 2021**). Además, la cepa con un valor mayor de absorbancia fue M3 L CFV con un valor de 3,1654. Cabe destacar que esta cepa produjo gran cantidad de espuma (**Figura 12**). Se han demostrado resultados comparables durante la producción de biosurfactantes de la cepa *P. aeruginosa* MR01 (**Lotfabad et al., 2009**). Algunos estudios mencionan que la acción espumante está relacionada con su capacidad para reducir la tensión superficial de los líquidos, es decir, cuanto más

baja sea la tensión superficial, mayor será la intensidad del efecto espumante (**Winterburn & Martin, 2012**).



Figura 12. La espuma formada representa a la capacidad para reducir la tensión superficial por parte de los aislados bacterianos.

Nota: La bacteria que formó esa cantidad de espuma fue la M3 L CFV.

En el ensayo de agar CTAB, es una forma específica de detectar surfactantes aniónicos en soluciones acuosas que pueden determinarse por la formación de un par iones insolubles con varias sustancias catiónicas (**Sun et al., 2018**), se obtuvieron un resultado positivo en los seis aislados bacterianos al presentar una coloración azul violeta tenue en los halos, después de la incubación a 37 °C por 48 h. Más aún, en la placa de la cepa VBRR1 ver en la **Tabla 6**, que tuvo una coloración violeta azul oscuro distintiva para los ramnolípidos, este color se debe a la reacción ocurrida entre los biosurfactantes glicolípidos aniónicos y el complejo catiónico CTAB- azul de metileno (**Perfumo et al., 2006**).

A través de la técnica MALDI- TOF analítica utilizada en la espectrometría de masas para la identificación y caracterización de moléculas, se determinó a las cepas bacterianas anteriormente evaluadas como *P. aeruginosa* (**Tabla 5**). Estos puntajes reflejan el grado de confianza en la identificación al comparar el espectro obtenido con una base de datos: valores superiores a 2,0 suelen considerarse indicativos de una identificación confiable a nivel de especie, y cuanto más alto es el puntaje (por encima de 2,2–2,3), mayor es la certeza de la asignación taxonómica (**Mohammad Y. Ashfaq et al., 2022**). De acuerdo con lo planteado por **Johnson et al. (2021)**, este tipo de bacteria produce un biosurfactante denominado ramnolípido, este posee una solubilidad acuosa óptima a pH

neutros incluso alcalinos. Este fenómeno se asocia a su naturaleza ácida, ya que contienen un único grupo de ácido carboxílico libre correspondiente a la fracción de ácido graso β -hidroxi, lo que confiere la naturaleza aniónica de los ramnolípidos (Azrad et al., 2019). A medida que el pH aumenta de 5 a 8, la carga negativa de la cabeza polar incrementa, lo que denota en una mayor solubilidad en agua (Mawgoud et al., 2009).

Tabla 5

Resultados de la identificación de los aislamientos por MALDI-ToF.

Aislamiento	Score	Género y especie
VBRR1	2,33	<i>P. aeruginosa</i>
VBRR2	2,23	<i>P. aeruginosa</i>
LL1 verde	2,31	<i>P. aeruginosa</i>
L CFV	2,24	<i>P. aeruginosa</i>
M3 L CFV	2,16	<i>P. aeruginosa</i>
LL3 verde	2,23	<i>P. aeruginosa</i>

Nota: Identificación confiable de las cepas evaluadas.

El ensayo de ERIC- PCR y su posterior análisis se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa, donde se evaluaron a las seis bacterias productoras de biosurfactantes, del cual se obtuvieron diferentes patrones de bandas de ADN. La construcción del árbol filogenético como se puede observar en la **Figura 13**, permitió distinguir el parentesco entre las cepas analizadas, debido a que esta técnica se utiliza ampliamente para determinar a los grupos filogenéticos y la diversidad genética de las cepas, mostrando la distribución de los grupos (Matta-Chuquisapon et al., 2022); como es el caso de las cepas LL3V y LCFV que comparten un ancestro común más reciente, lo podría indicar una relación genética con poca divergencia entre ambas, lo que hace referencia a que pueden pertenecer a la misma subpoblación.

El nodo existente entre las cepas LL1V y M3 L CFV comparten un ancestro común más cercano entre ellas, pero más lejano el grupo mencionado anteriormente (LL3V y LCFV). El nodo que agrupa LL3V y LCFV con LL1V y M3 L CFV puede representar un ancestro común, por su relación genética que divergen en dos subgrupos principales. Además, el nodo entre VBRR 1 y VBRR 2 está bastante relacionado, ya que comparten un nodo propio y tiene ramas cortas, lo que indicaría que son clones al ser genéticamente muy similares. Cabe mencionar que, el nodo conecta el grupo VBRR 1 y VBRR 2 con las demás cepas, se encuentra en un punto alejado, lo que podría indicar que poseen una variación genética significativa.

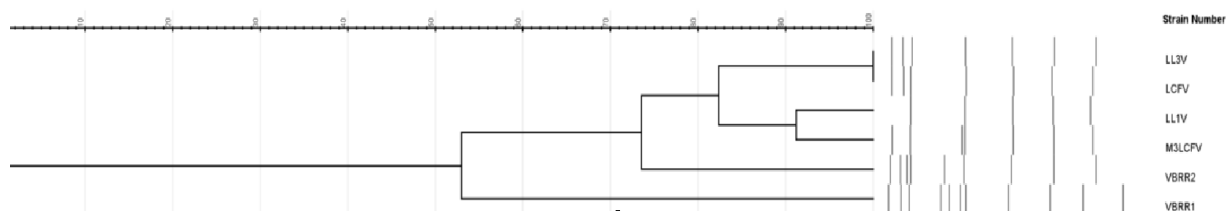
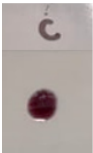
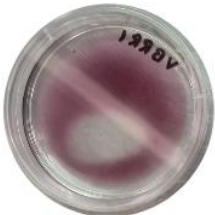
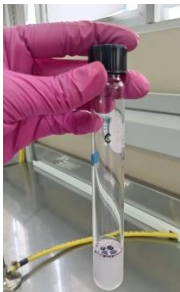
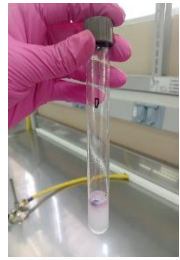
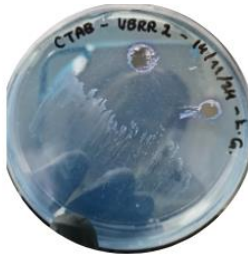
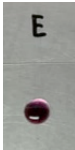
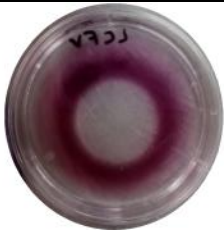
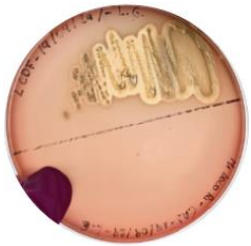
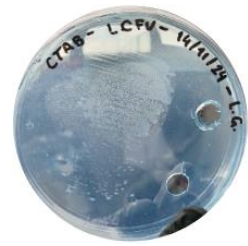


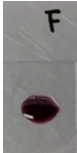
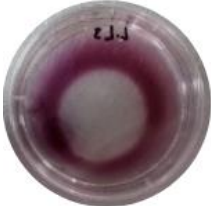
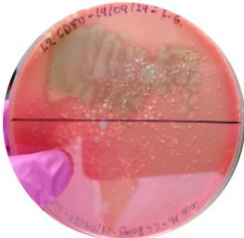
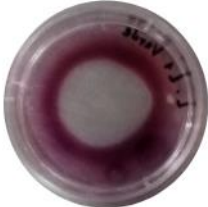
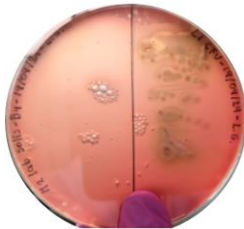
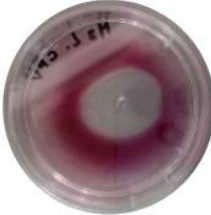
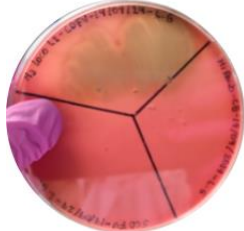
Figura 13. ERIC-PCR: Relación filogenética entre las cepas de *P. aeruginosa* productoras de biosurfactantes.

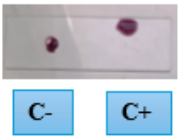
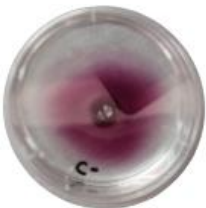
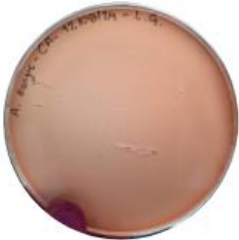
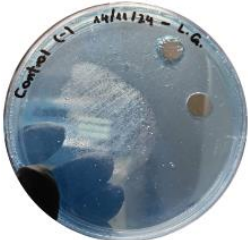
En la **Tabla 6**, se resumen los resultados de los aislamientos seleccionados, los cuales procedieron a ser analizados en las posteriores etapas experimentales. Los ambientes contaminados son reservorios adecuados para el conjunto seleccionado de microorganismos que dependen de una única naturaleza química del contaminante liberado en el medio ambiente y el nivel de contaminación (**Samsu et al., 2020**). Según varios investigadores los géneros autóctonos encontrados en entornos contaminados con hidrocarburos habitualmente son *B. cereus*, *Pseudomonas* sp., *B. subtilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes* sp., *Enterococcus* sp. (**Chebbi et al., 2017; Hassan et al., 2018**).

Tabla 6

Resultados positivos obtenidos de las pruebas realizadas para encontrar los aislamientos con capacidad de producción de biosurfactantes.

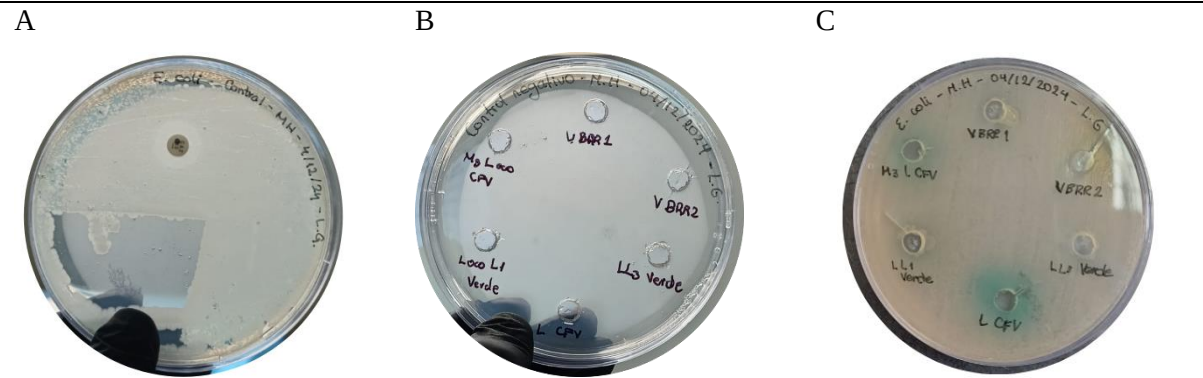
Aislamiento	Colapso de la gota por caída	Propagación del aceite	Actividad hemolítica	Emulsificación (A _{610 nm})	Agar CTAB
VBRR1		 D: 2,1 cm			
VBRR2		 D: 2,7 cm			
L CFV		 D: 2 cm			

Aislamiento	Colapso de la gota por caída	Propagación del aceite	Actividad hemolítica	Emulsificación (A _{610 nm})	Agar CTAB
LL3Verde		 D: 2,5 cm			
LL1Verde		 D: 2,3 cm			
M3 LCFV		 D: 2,3 cm			

Aislamiento	Colapso de la gota por caída	Propagación del aceite	Actividad hemolítica	Emulsificación (A _{610 nm})	Agar CTAB
Control (-)		 D: 0 cm			

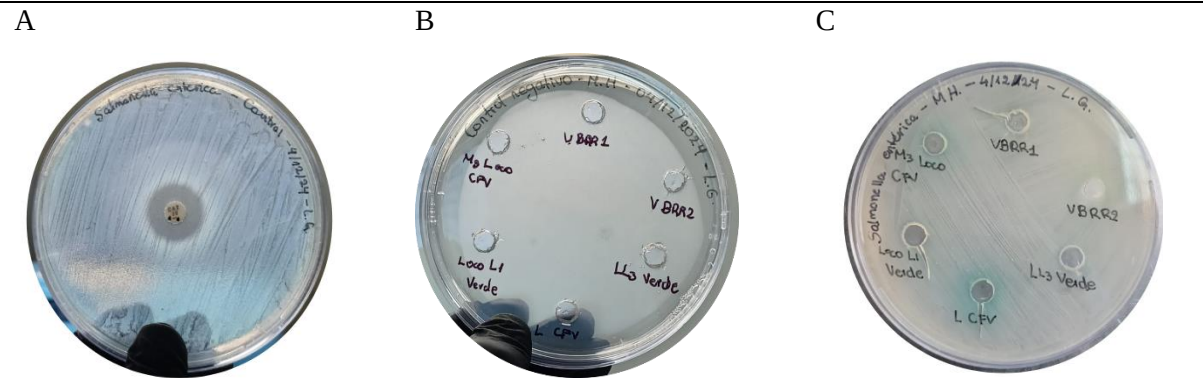
Con respecto a la actividad antimicrobiana se evaluaron patógenos bacterianos transmitidos por alimentos como *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus* y *B. cereus* frente a los filtrados de las seis cepas evaluadas previamente donde se obtuvieron resultados negativos para *E. coli* (Tabla 7) *S. enterica* (Tabla 8) y resultados parcialmente positivos para *S. aureus* (Tabla 9) y *B. cereus* (Tabla 10).

Tabla 7
Actividad antimicrobiana de los filtrados libres de células vs *E. coli*.



Nota. El control positivo se utilizó ceftazidima CAZ30 (A), control negativo (B) y evaluación antimicrobiana con los filtrados sobre el inóculo de la bacteria escogida (C).

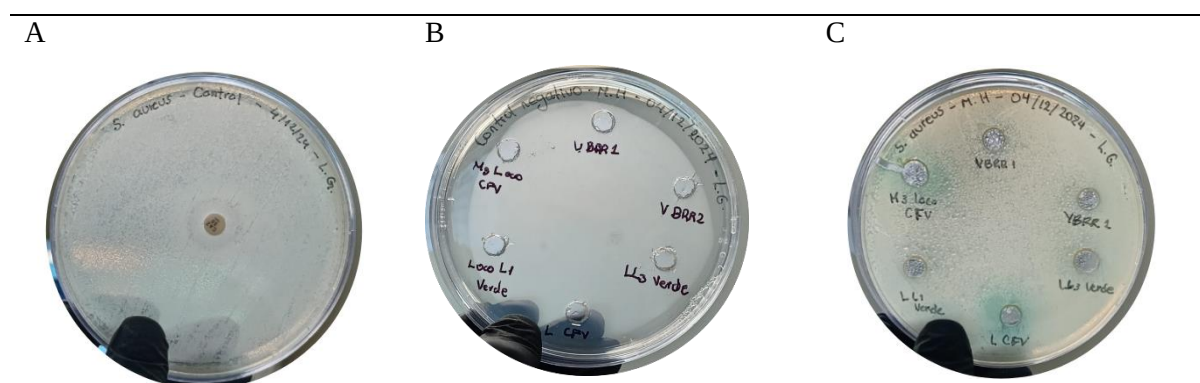
Tabla 8
Actividad antimicrobiana de los filtrados libres de células vs *S. enterica*



Nota: El control positivo se utilizó ceftazidima CAZ30 (A), control negativo (B) y evaluación antimicrobiana con los filtrados sobre el inóculo de la bacteria escogida (C).

Tabla 9

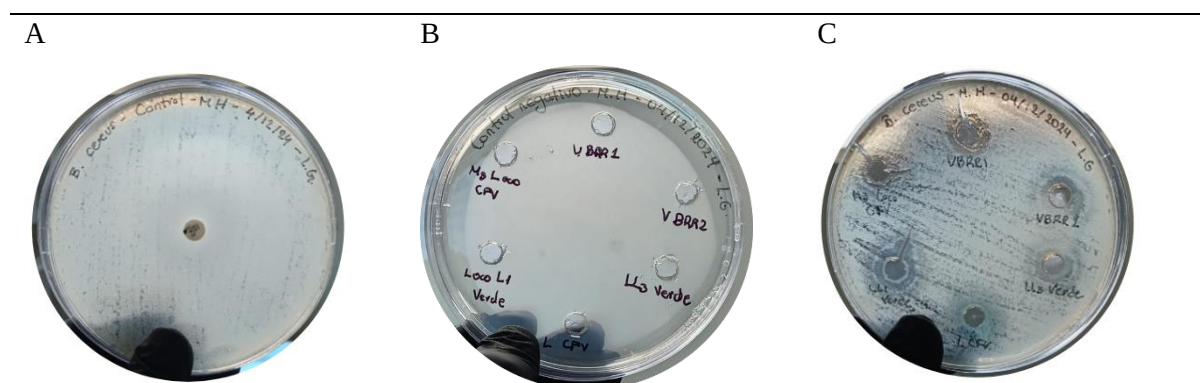
Actividad antimicrobiana de los filtrados libres de células vs *S. aureus*.



Nota: El control positivo se utilizó ceftazidima CAZ30 (A), control negativo (B) y evaluación antimicrobiana con los filtrados sobre el inóculo de la bacteria escogida (C).

Tabla 10

Actividad antimicrobiana de los filtrados libres de células vs *B. cereus*.



Nota: El control positivo se utilizó ceftazidima CAZ30 (A), control negativo (B) y evaluación antimicrobiana con los filtrados sobre el inóculo de la bacteria escogida (C).

A partir de lo planteado por **Thakur et al. (2021)**, los ramnolípidos pueden emplearse como una opción para prevenir la contaminación alimentaria gracias a su capacidad antimicrobiana frente a una amplia variedad de microorganismos. Lo que se concuerda con el estudio realizado por **Freitas et al. (2019)**, a diferentes valores de pH para verificar las actividades antimicrobianas de los ramnolípidos contra bacterias patógenas, debido a que este es un factor clave para el desarrollo de los microorganismos. A un pH de 7, los ramnolípidos reprimieron el crecimiento de *B. cereus* y *Listeria monocytogenes* mostraron valores de (concentración mínima inhibitoria) MIC = 156,2 µg/mL y MIC = 19,5 µg/mL, sin embargo, mostraron un efecto inhibitorio tenue sobre *S. aureus* reduciendo el rango de pH entre 5-6. Por el contrario, en bacterias gramnegativas como *E. coli*, *S. enterica*, los ramnolípidos no habían mostrado actividad antimicrobiana en varios niveles de pH, debido a la función protectora de la membrana celular

externas de las bacterias gramnegativas. Cabe mencionar que mediante el ensayo till-kill descubrieron que en 30 min los ramnolípidos pueden lisar células de *B. cereus* al destruir la membrana citoplasmática y reduciendo la hidrofobicidad de la superficie (Freitas et al., 2019).

3.2. Biodegradación de aceite

Las tasas de biodegradación de hidrocarburos de aceite comestible de seis bacterias productoras de biosurfactantes (VBRR1, VBRR2, L CFV, L L3 Verde, L L1 Verde, M3 L CFV) fueron probadas mediante el método gravimétrico con distintas fuentes de carbono, en el primer ensayo solo se colocó aceite comestible 2% sin sustrato como se ilustra en la **Figura 14**, mientras que, en el segundo ensayo con sustrato, ya que se colocó 2% de aceite comestible, melaza y azúcar (**Figura 15**), respectivamente. Después de dos semanas de incubación a temperatura ambiente. El aceite comestible del control, donde no existió degradación. En comparación con respecto a los frascos, en donde, se han inoculado el caldo de cultivo bacteriano, de esta forma las sustancias granulares blancas flotando en el caldo de cultivo que se pegaban en las paredes de los frascos. Lo que se concuerda con el estudio realizado por Su et al. (2011), en proceso de degradación de aceite de motor por *P. aeruginosa* SU-1, al mostrar unas partículas blancas llamadas biofloculantes.

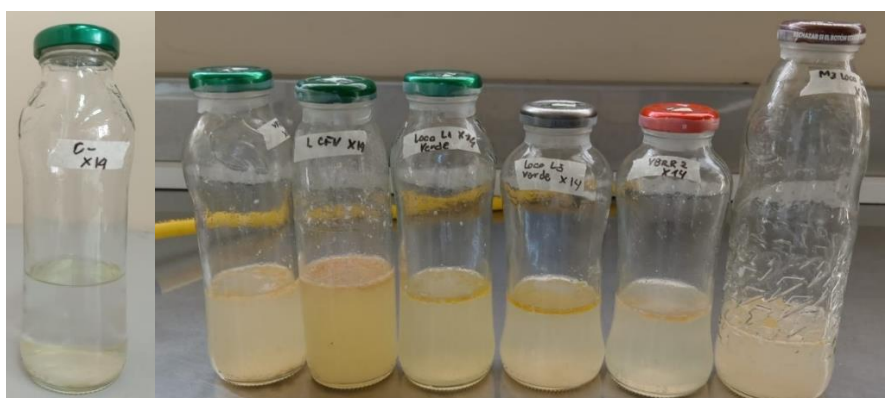


Figura 14. Biodegradación de aceite sin sustrato (aceite comestible como fuente de carbono) después de dos semanas de incubación.

Nota: En la izquierda se encuentra el control (-).



Figura 15. Biodegradación del segundo ensayo con sustrato (aceite comestible + melaza+ azúcar como fuente de carbono) después de dos semanas de incubación.

Nota: En la izquierda se encuentra el control (-).

En la biodegradación de aceite sin sustrato como se puede observar en la **Figura 16**, las cepas que tuvieron un mejor rendimiento fueron L CFV, VBRR2, VBRR1; debido a que su nivel de biodegradación se encontró en un aproximado de 0,1 de la concentración del aceite al final de los 14 días de incubación. Del mismo modo, en la biodegradación con sustrato como se muestra en la **Figura 17**, la cepa con mayor biodegradación fue L L3 Verde. Todas las cepas en ambos ensayos tienen una semejanza notable, debido a que mantienen una estabilidad a partir del séptimo día que puede deberse a que este tipo de bacterias tienen preferencia por descomponer en primer lugar a componentes de cadena corta, debido a que las bacterias pueden crecer y desarrollarse con mayor facilidad, denotando con tasas de degradación de esta clase de alcanos sea mayor (**Chemlal et al., 2013**). Sin embargo, al mismo tiempo se secretan enzimas hidrolíticas para degradar componentes complejos, que también dan lugar a productos intermedios tóxicos, que va dificultando una degradación continua de n-alcanos de cadena larga (**Chemlal et al., 2013; Ghanem & Al-Zahrani, 2016**). Sumado a esto, las enzimas que controlan las reacciones enzimáticas encargadas de la degradación de los hidrocarburos cambian de acuerdo con la longitud de la cadena de carbono (**Beilen & Funhoff, 2007**). Según **Sun et al. (2018)**, es probable que la expresión enzimática responsable de los hidrocarburos con distintas longitudes de cadena de carbono en las bacterias varíen.

Según los estudios realizados por **Striebich et al. (2014)**, el grado de degradación de distintos hidrocarburos se encuentra relacionado con su estructura molecular y la tasa de biodegradación disminuye cuando la estructura molecular se vuelve compleja. Además, la degradación de los n-alcanos por *Pseudomonas sp.* CQ2 tiende a disminuir progresivamente a medida que aumenta el número de carbonos de n-alcano, lo cual concuerda con esta observación (**Sun et al., 2018**).

Por lo tanto, a medida que aumenta el número de carbonos en los n-alcanos presentes en el aceite, las tasas de degradación por parte de *Pseudomonas sp.* CQ2 tienden a ser más bajas (Sun et al., 2018).

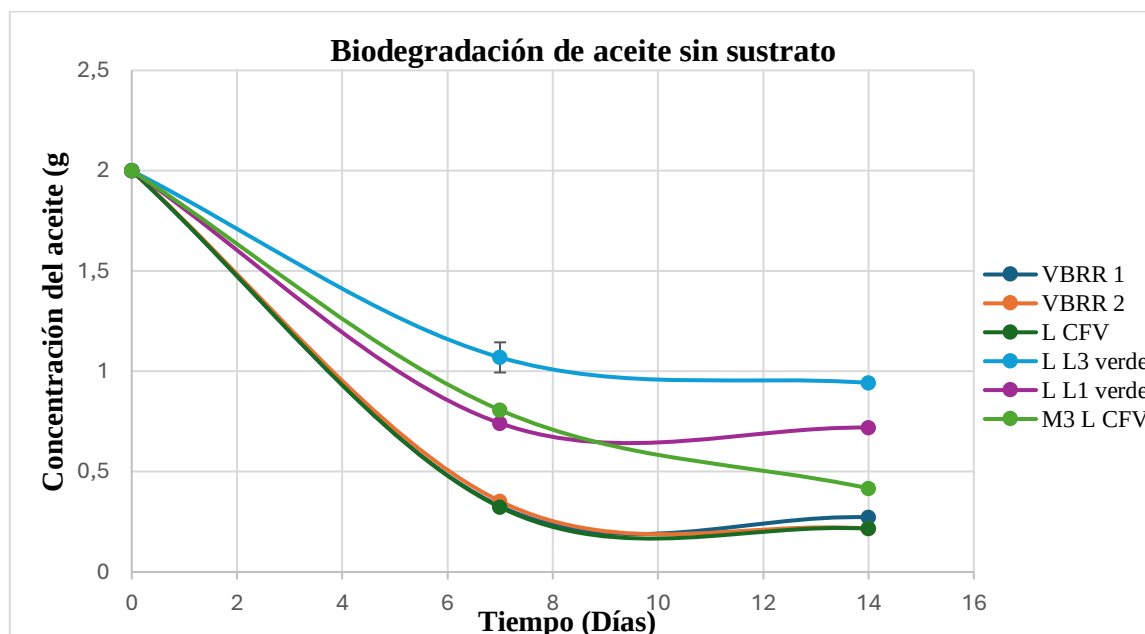


Figura 16. Biodegradación del primer ensayo a través del método gravimétrico.

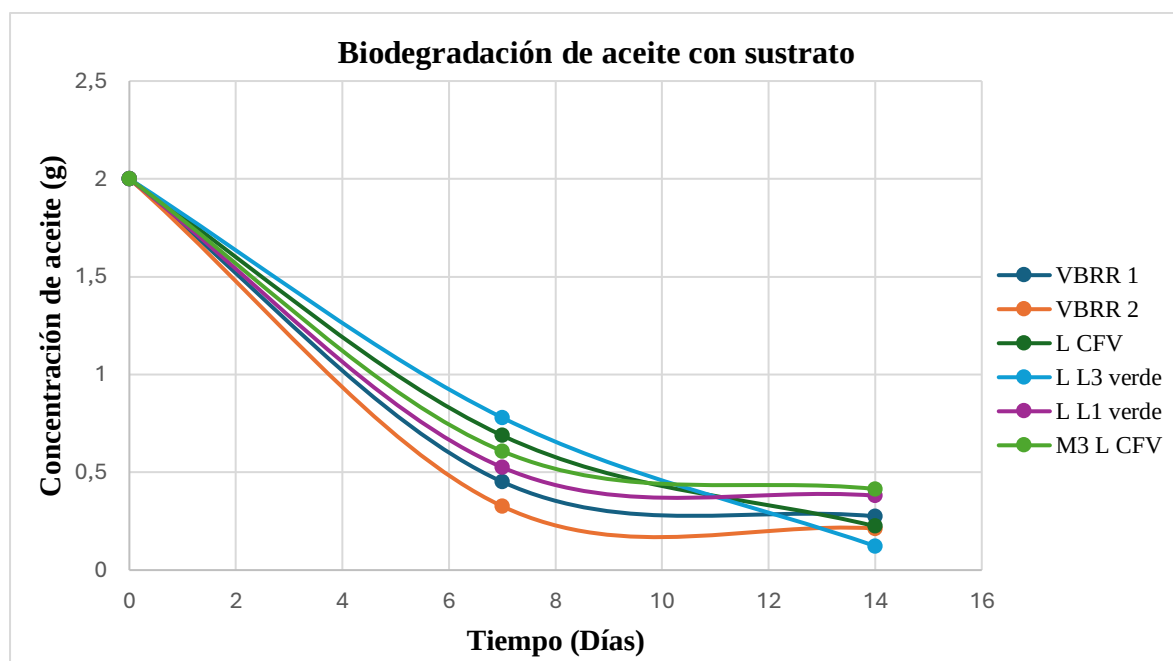


Figura 17. Biodegradación del segundo ensayo a través del método gravimétrico.

Tabla 11

Biodegradación del aceite sin sustrato.

Bacteria	Aceite (g)		
	0 días	7 días	14 días
VBRR 1	2,0012 ± 0,0006	0,3282 ± 0,0087	0,2724 ± 0,0133
VBRR 2	2,0020 ± 0,0008	0,3524 ± 0,0072	0,2158 ± 0,0131
L CFV	2,0001 ± 0,0012	0,3225 ± 0,0049	0,2154 ± 0,0123
L L3 verde	2,0009 ± 0,0032	1,0695 ± 0,0752	0,9424 ± 0,0139
L L1 verde	2,0011 ± 0,0024	0,7413 ± 0,0176	0,7199 ± 0,0065
M3 L CFV	2,0008 ± 0,0014	0,8070 ± 0,0117	0,4168 ± 0,0179

Nota. Representa el promedio de las diferencias en las repeticiones realizadas en el ensayo 1 ± la desviación estándar.

Tabla 12

Biodegradación del aceite con sustrato.

Bacteria	Aceite (g)		
	0 días	7 días	14 días
VBRR 1	20,001 ± 0,0015	0,4513 ± 0,0101	0,2747 ± 0,0045
VBRR 2	20,001 ± 0,0009	0,3264 ± 0,0075	0,2129 ± 0,0117
L CFV	20,009 ± 0,0013	0,6878 ± 0,0104	0,2242 ± 0,0062
L L3 verde	20,016 ± 0,0011	0,7792 ± 0,0091	0,1230 ± 0,0074
L L1 verde	20,015 ± 0,0013	0,5252 ± 0,0092	0,3804 ± 0,0096
M3 L CFV	20,018 ± 0,0008	0,6079 ± 0,0068	0,4145 ± 0,0113

Nota. Representa el promedio de las diferencias en las repeticiones realizadas en el ensayo 2 ± la desviación estándar.

El análisis estadístico de la biodegradación de petróleo realizado con los seis aislamientos seleccionados (VBRR1, VBRR2, L CFV, L L3 verde, L L1 verde, M3 L CFV) y un grupo control incluyó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey (**Anexo 10**). Los resultados del ANOVA revelaron diferencias altamente significativas entre los grupos ($P < 0.0001$). El valor de eta cuadrado ($\eta^2 = 0.9998$) indica que casi toda la variabilidad en la biodegradación puede atribuirse a las diferencias entre las cepas bacterianas y el grupo control. Esto demuestra que las

cepas tienen un impacto significativo en la biodegradación. La prueba de comparaciones múltiples de Tukey evidenció diferencias significativas. Por ejemplo, VBRR1 mostró una biodegradación significativamente mejor que VBRR2, y L L3 verde superó a L CFV ($P<0.0001$). Estos resultados destacan la variabilidad en la eficiencia de biodegradación entre las cepas, con algunas como VBRR2 y L L3 verde mostrando un potencial prometedor para aplicaciones de biodegradación de hidrocarburos ver los **Anexos 10 y 11**.

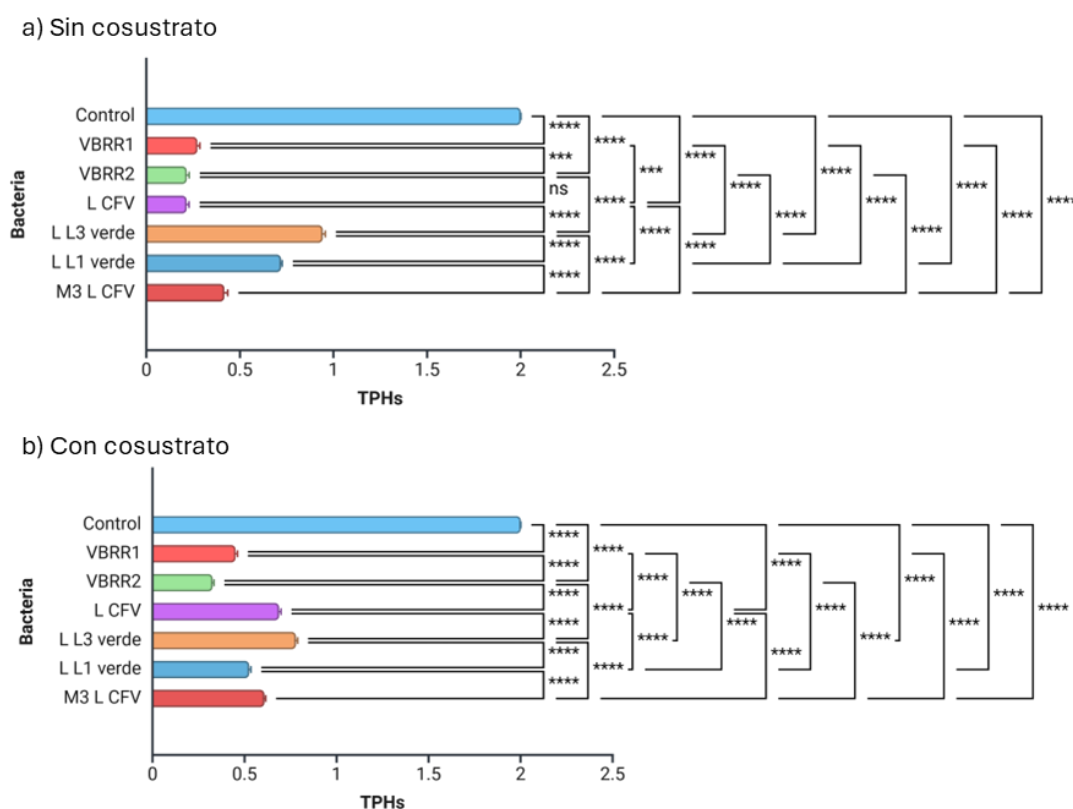


Figura 18. Comparación de la eficiencia en la biodegradación de petróleo entre diferentes cepas bacterianas y el control mediante el análisis gravimétrico (TPHs, como aceite).

Nota: Los asteriscos (**) y (***) indican niveles de significancia estadística con $P<0.001$, y $P<0.0001$, respectivamente, ns indica no significativo, según la prueba de Tukey.

Como se puede observar la cepa L CFV presenta valores bastante similares en todos los tiempos, sobre todo a culminar las dos semanas de incubación, esto podría indicar que la biodegradación que realiza es independiente al sustrato añadido, es probable que esta cepa posea lipasas eficientes que permitan biodegradar aceite sin la necesidad de utilizar un sustrato para potenciar su actividad. Según el estudio realizado por **Shi et al. (2020)**, donde la cepa de *P. aeruginosa* M4 degradó eficazmente el aceite de cocina usado como única fuente de carbono sin requerir de sustrato adicional para producir biosurfactantes valiosos. Lo mismo ocurre con la cepa VBRR 1 y VBRR 2 que presentan

comportamientos similares bajo estas condiciones, lo que denota que la presencia de sustrato tiene poco impacto sobre el rendimiento de la biodegradación.

3.2. Hipótesis

Hipótesis nula (H₀): Las cepas bacterianas aisladas de suelos contaminados con aceites usados de lubricadoras en Ambato no producen biosurfactantes ni presentan diferencias significativas en su capacidad para biodegradar aceites mediante análisis gravimétrico.

Hipótesis alternativa (H_i): Existen cepas bacterianas aisladas de suelos contaminados con aceites usados de lubricadoras en Ambato que producen biosurfactantes y presentan diferencias significativas en su capacidad para biodegradar aceites, demostrada mediante análisis gravimétrico.

Resultado: Se acepta la hipótesis alternativa (H_i). Los datos demuestran que las cepas bacterianas aisladas no solo producen biosurfactantes, sino que estas propiedades contribuyen a su capacidad para biodegradar aceites de manera eficiente. Entre las cepas evaluadas, se destacan VBRR2 y L L3 verde, que no solo lograron un alto rendimiento en biodegradación, sino que también producen biosurfactantes, lo cual refuerza su potencial para aplicaciones biotecnológicas en la remediación de suelos contaminados con aceites usados. Estos hallazgos subrayan la importancia de la bioprospección de microorganismos autóctonos en suelos contaminados.

4. CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se llevó a cabo una bioprospección en suelos contaminados con aceites usados provenientes de lubricadoras ubicadas en Ambato, lo que permitió aislar 43 cepas bacterianas autóctonas. Estas cepas fueron sometidas a una serie de ensayos fenotípicos y bioquímicos que identificaron su potencial para la producción de biosurfactantes.
- De la colección inicial de 43 cepas aisladas, se identificaron seis cepas bacterianas con capacidad para producir biosurfactantes. La selección se realizó mediante ensayos de colapso de la gota por caída, dispersión de aceite, actividad hemolítica, agar CTAB y pruebas de emulsificación. Estos métodos permitieron confirmar el potencial biosurfactante de los aislados seleccionados.
- Las seis cepas seleccionadas (VBRR1, VBRR2, L CFV, L L3 Verde, L L1 Verde, M3 L CFV) mostraron resultados positivos en todas las pruebas fenotípicas y bioquímicas realizadas, confirmando su capacidad de producción de biosurfactantes. Adicionalmente, la identificación molecular por la técnica MALDI-TOF determinó que los seis aislados pertenecen a la especie *P. aeruginosa*, un género ampliamente reconocido por su potencial en la producción de biosurfactantes.
- Los ensayos gravimétricos confirmaron que las cepas seleccionadas poseen una alta capacidad para biodegradar aceites usados. Las diferencias significativas en la eficiencia de biodegradación entre las cepas fueron validadas mediante análisis estadísticos, destacándose algunas cepas como VBRR2 y L L3 Verde por su desempeño superior en la reducción de la concentración de hidrocarburos.

4.2. Recomendaciones

- Es fundamental realizar estudios posteriores que permitan la caracterización estructural detallada de los biosurfactantes producidos por las cepas seleccionadas. Para ello, se recomienda el uso de técnicas avanzadas como espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (MS) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Estos análisis permitirán determinar la composición química y las estructuras moleculares de los compuestos.
- Se deben evaluar las propiedades físico-químicas de los biosurfactantes, incluyendo su actividad superficial, capacidad de emulsificación, estabilidad térmica y tolerancia a pH extremos y alta salinidad. Estas características son clave para determinar su potencial en aplicaciones industriales, como la limpieza de suelos contaminados, la remoción de hidrocarburos y la mejora en la recuperación de petróleo.
- Es importante realizar la secuenciación del genoma completo de las cepas seleccionadas para identificar los genes responsables de la producción de biosurfactantes y su regulación. Este análisis genómico permitirá comprender las rutas metabólicas involucradas y las posibles estrategias para optimizar su producción.
- Complementariamente, se recomienda implementar estudios de expresión génica mediante técnicas como RT-qPCR o transcriptómica para evaluar cómo diferentes condiciones ambientales y de cultivo afectan la expresión de genes clave en la síntesis de biosurfactantes.
- Es pertinente realizar estudios filogenéticos y de diversidad genética para explorar las relaciones evolutivas de las cepas aisladas con otros microorganismos productores de biosurfactantes. Esto podría revelar variaciones genéticas relevantes y estrategias para la mejora de su potencial biotecnológico.
- En relación con la producción de biosurfactantes, se sugiere optimizar las condiciones de cultivo analizando factores como el tipo de sustrato, la concentración de nutrientes, el pH, la temperatura y la aireación. Estos estudios deben incluir experimentos a escala piloto para evaluar la viabilidad industrial y la eficiencia de los biosurfactantes en aplicaciones específicas.
- Es crucial investigar la toxicidad y biodegradabilidad de los biosurfactantes producidos por estas cepas para garantizar su seguridad en aplicaciones ambientales e industriales. Además, se

recomienda explorar su interacción sinérgica con otras estrategias biotecnológicas, como la bioestimulación y la bioaumentación, para maximizar su efectividad en la remediación de suelos y aguas contaminadas.

5. Bibliografía:

- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A.-H. (2009). Characterization of Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Bs20. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2), 329-345. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8285-1>
- Abdulredha, M. M., Siti Aslina, H., & Luqman, C. A. (2020). Overview on petroleum emulsions, formation, influence and demulsification treatment techniques. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 3403-3428. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.11.014>
- Adetunji, A., & Oufolahan, A. (2021). *Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X20305465?via%3Dihub>
- Akbari, S., Hamid, N., Yunus, R., Fayaz, F., & Alara, R. (2018). *Biosurfactants—A new frontier for social and environmental safety: A mini review—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452072118300182>
- Alif Chebbi, , Dorra Hentati, , Hatem Zaghdien, , Nidhal Baccar, , Fatma Rezgui, , Manel Chalbi, , Sami Sayadi, & Mohamed Chamkha. (2017). *Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated Pseudomonas sp. Strain from used motor oil-contaminated soil—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830517306492>
- Al-Rubaye, A. H., Jasim, D. J., Ameen, H. F. M., Al-Robai, H. A., & Al-Assal, J. R. (2023). The Impacts of Petroleum on Environment. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1158(3), 032014. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1158/3/032014>
- Arai, M., Suzuki, T., Kaneko, Y., Miyake, M., & Nishikawa, N. (2001). Properties of Aggregates of Amide Guanidine Type Cationic Surfactant with 1-Hexadecanol Adsorbed on Hair. *Studies in Surface Science and Catalysis*, 132, 1005-1008. [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(01\)82254-0](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(01)82254-0)
- Aulet de Saab, O. C., de Castillo, M. C., de Ruiz Holgado, A. P., & de Nader, O. M. (2001). A comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(4), 583-586. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762001000400022>
- Ayan, L., Macías Coutiño, P., Maza González, M., Vázquez, R., & Guevara-Hernández, F. (2021). Microorganismos del suelo y sus usos potenciales en la agricultura frente al escenario del cambio climático. *Magna Scientia UCEVA*, 1, 104-119. <https://doi.org/10.54502/msuceva.v1n1a14>
- Azevedo, C. R. F. (2007). Failure analysis of a crude oil pipeline. *Engineering Failure Analysis*, 14(6), 978-994. <https://doi.org/10.1016/j.engfailanal.2006.12.001>

- Aziz, Z. S., Jazza, S. H., Dageem, H. N., Banoon, S. R., Balboul, B. A., & Abdelzaher, M. A. (2024). Bacterial biodegradation of oil-contaminated soil for pollutant abatement contributing to achieve sustainable development goals: A comprehensive review. *Results in Engineering*, 22, 102083. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2024.102083>
- Azrad, M., Keness, Y., Nitzan, O., Pastukh, N., Tkhawkho, L., Freidus, V., & Peretz, A. (2019). Cheap and rapid in-house method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS technology. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3709-9>
- Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 495-508. <https://doi.org/10.1007/s002530051648>
- Becerra Gutiérrez, L. K., & Horna Acevedo, M. V. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23-31. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.01.03>
- Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I., & Manresa, A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85(1), 1-8. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020148.45523.41>
- Bhattacharai, A., Bhattacharai, B., & Pandey, S. (2015). Variation of soil microbial population in different soil horizons. *Journal of Microbiology & Experimentation*, Volume 2(Issue 2). <https://doi.org/10.15406/jmen.2015.02.00044>
- Bidja Abena, M. T., Li, T., Shah, M. N., & Zhong, W. (2019). Biodegradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in highly contaminated soils by natural attenuation and bioaugmentation. *Chemosphere*, 234, 864-874. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.111>
- Bjerk, T., Severino, P., Jain, S., Marques, C., Silva, A., Pashirova, T., & Souto, E. (2021). *Biosurfactants: Properties and Applications in Drug Delivery, Biotechnology and Ecotoxicology*. <https://www.mdpi.com/2306-5354/8/8/115>
- Bognolo, G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152(1), 41-52. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00684-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00684-0)
- Bubenheim, D., Wignarajah, K., Berry, W., & Wydeven, T. (1997). Phytotoxic Effects of Gray Water Due to Surfactants. *Journal of the American Society for Horticultural Science. American Society for Horticultural Science*, 122. <https://doi.org/10.21273/JASHS.122.6.792>
- Bucka, F. B., Felde, V. J. M. N. L., Peth, S., & Kögel-Knabner, I. (2021). Disentangling the effects of OM quality and soil texture on microbially mediated structure formation in artificial model soils. *Geoderma*, 403, 115213. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115213>

- Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I., & Giulietti, A. M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12(1), 82-84. <https://doi.org/10.1007/BF00327807>
- Chemlal, R., Abdi, N., Lounici, H., N. Drouiche a, A. Pauss, & N. Mameri c. (2013). *Modeling and qualitative study of diesel biodegradation using biopile process in sandy soil—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830513000024?via%3Dihub>
- Chen G., Lin J., Hu W., Cheng C., Zhang J., & Qu C. (2018). *Characteristics of a crude oil composition and its in situ waxing inhibition behavior—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016236117316988?via%3Dihub>
- Chen, Q., Tian, M., Kasomo, R. M., Li, H., Zheng, H., Song, S., Luo, H., & He, D. (2020). *Depression effect of Al(III) and Fe(III) on rutile flotation using dodecylamine polyxyethylene ether as collector—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927775720308621>
- Coelho, A. L. S., Feuser, P. E., Carciofi, B. A. M., de Oliveira, D., & de Andrade, C. J. (2020). Biological activity of mannosylerythritol lipids on the mammalian cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(20), 8595-8605. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10857-9>
- Cross, J., & Singer, E. J. (Eds.). (2019). *Cationic Surfactants: Analytical and Biological Evaluation*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429270376>
- Cserhádi, T., Forgács, E., & Oros, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, 28(5), 337-348. [https://doi.org/10.1016/s0160-4120\(02\)00032-6](https://doi.org/10.1016/s0160-4120(02)00032-6)
- Dai, C., Han, Y., Duan, Y., Lai, X., Fu, R., Liu, S., Leong, K. H., Tu, Y., & Zhou, L. (2022). Review on the contamination and remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal soil and sediments. *Environmental Research*, 205, 112423. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112423>
- Drummond, C. J., & Fong, C. (1999). Surfactant self-assembly objects as novel drug delivery vehicles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 4(6), 449-456. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(00\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(00)00020-0)
- Effendi, I., Nedi, S., Ellizal, Nursyirwani, Feliatra, Fikar, Tanjung, Pakpahan, R., & Pratama. (2017). Detergent Disposal into Our Environment and Its Impact on Marine Microbes. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 97(1), 012030. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/97/1/012030>
- EPA. (2000). *Method 1664, Revision A: N-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated n-Hexane Extractable Material (SGT-HEM; Non-polar Material) by Extraction and Gravimetry*.
- Essghaier, B., Dridi, R., Arouri, A., & Zid, M. F. (2021). Synthesis, structural characterization and prospects for a new tris (5-methylbenzimidazole) tris (oxalato) ferrate(III) trihydrate complex

- as a promising antibacterial and antifungal agent. *Polyhedron*, 208, 115420. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2021.115420>
- Fan, R., Ma, W., & Zhang, H. (2020). Microbial community responses to soil parameters and their effects on petroleum degradation during bio-electrokinetic remediation. *Science of The Total Environment*, 748, 142463. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142463>
- Feng, L., Jiang, X., Huang, Y., Wen, D., Fu, T., & Fu, R. (2021). Petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation assisted by isolated bacterial consortium and sophorolipid. *Environmental Pollution*, 273, 116476. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116476>
- Fenibo, E. O., Ijoma, G. N., Selvarajan, R., & Chikere, C. B. (2019). Microbial Surfactants: The Next Generation Multifunctional Biomolecules for Applications in the Petroleum Industry and Its Associated Environmental Remediation. *Microorganisms*, 7(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110581>
- Fletcher, P. (1996). *Self-assembly of micelles and microemulsions—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359029496800501>
- Garzón, L. E., Rodrigues, A. C., & Guerrero, C. (2023). *The need for an environmental strategy in the oil, gas and petrochemical industries—IOPscience*. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/2594/1/012061>
- George, S., & Jayachandran, K. (2009). Analysis of rhamnolipid biosurfactants produced through submerged fermentation using orange fruit peelings as sole carbon source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158(3), 694-705. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8337-6>
- Ghanem, K. M., & Al-Zahrani, M. A. (2016). Bioremediation of Diesel Fuel by Fungal Consortium Using Statistical Experimental Designs. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(1), 97-106. <https://doi.org/10.15244/pjoes/42493>
- Gitipour, S. (2015). *Soil Washing for Reduction of Aromatic and Aliphatic Contaminants in Soil—Gitipour—2015—CLEAN – Soil, Air, Water—Wiley Online Library*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/clen.201100609>
- Gonzalez-Garcia, H., Pedraza, A. F. G., Zambrano, M. P., Escalante-Garcia, H., Rodriguez-Yzquierdo, G., & Soto-Bracho, A. (2021). Edaphic microbiota in plantain lots of contrasting vigor and relationships with soil properties/MICROBIOTA EDAFICA EN LOTES DE PLATANO CON VIGOR CONTRASTANTE Y SU RELACION CON PROPIEDADES DEL SUELO. *BIOAGRO*, 33(2), 143-151. <https://go.gale.com/ps/i.do?p=AONE&sw=w&issn=13163361&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA661739554&sid=googleScholar&linkaccess=abs>
- Gran View Research. (2024). *Surfactants Market Size, Share And Growth Report, 2030*. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/surfactants-market>
- Guilcamaigua, D., Quintero, N., Jiménez, M. E., & Muñoz, D. (2019). *Absorción de aceites y grasas en aguas residuales de lavadoras y lubricadoras de vehículos utilizando absorbentes*

- naturales—3Ciencias*. <https://3ciencias.com/articulos/articulo/absorcion-de-aceites-y-grasas-en-aguas-residuales-de-lavadoras-y-lubricadoras-de-vehiculos-utilizando-absorbentes-naturales/>
- Guirado, M., García-Delgado, C., Pindado, O., de la Torre, B. O., Escolano, O., Eymar, E., & Millán, R. (2023). Bioremediation study of a hydrocarbon-contaminated soil by profiling aromatic and aliphatic chains. *Applied Soil Ecology*, 190, 104983. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.104983>
- Güleç, N., & Kabak, Ö. (2024). Data-Driven Heuristic Optimization for Complex Large-Scale Crude Oil Operation Scheduling. *Processes*, 12(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/pr12050926>
- Gurkok, S. (2022). Chapter 10—Screening of high yield biosurfactant producing strains of agribiotechnological importance. En Dr. Inamuddin & C. O. Adetunji (Eds.), *Applications of Biosurfactant in Agriculture* (pp. 163-180). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822921-7.00002-7>
- Harms, H., & Bosma, T. N. P. (1997). Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18(2-3), 97-105. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900259>
- Hassan, K. A., Sani, Y., & Ajoke, O. Y. (2018). Preliminary Screening of Bio-surfactant Producing Bacteria Isolated from an Oil Contaminated Soil. *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, 1-9. <https://doi.org/10.9734/ajbgmb/2018/v1i1465>
- Haytham M.M. Ibrahim. (2018). *Characterization of biosurfactants produced by novel strains of Ochrobactrum anthropi HM-1 and Citrobacter freundii HM-2 from used engine oil-contaminated soil—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S111006211630174X>
- Holmberg, K. (2001). Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6, 148-159. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(01\)00074-7](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(01)00074-7)
- Hussain, I., Puschenreiter, M., Gerhard, S., Schöftner, P., Yousaf, S., Wang, A., Syed, J. H., & Reichenauer, T. G. (2018). Rhizoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils: Improvement opportunities and field applications. *Environmental and Experimental Botany*, 147, 202-219. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.12.016>
- Ibrahim, M. L., Ijah, U. J. J., Manga, S. B., Bilbis, L. S., & Umar, S. (2013). Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.11.012>
- Ibrar, M., & Zhang, H. (2020). Construction of a hydrocarbon-degrading consortium and characterization of two new lipopeptides biosurfactants. *Science of The Total Environment*, 714, 136400. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136400>
- Ivanković, T., & Hrenović, J. (2010). Surfactants in the environment. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 61(1), 95-110. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-1943>

- Jahan, R., Bodratti, A., Tsianou, M., & Alexandridis, M. (2020a). *Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications*—ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001868619302544?via%3Dihub>
- Jahan, R., Bodratti, A., Tsianou, M., & Alexandridis, P. (2020b). *Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications*—ScienceDirect. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>
- Jakeline de Freitas Ferreira , Estevão Alan Vieira , Marcia Nitschke. (2019). *The antibacterial activity of rhamnolipid biosurfactant is pH dependent*—PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30717003/>
- Johnson, P., Trybala, A., Starov, V., & Pinfield, V. J. (2021a). Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. *Advances in Colloid and Interface Science*, 288, 102340. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102340>
- Johnson, P., Trybala, A., Starov, V., & Pinfield, V. J. (2021b). Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. *Advances in Colloid and Interface Science*, 288, 102340. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102340>
- Kebede, G., Tafese, T., Abda, E. M., Kamaraj, M., & Assefa, F. (2021). Factors Influencing the Bacterial Bioremediation of Hydrocarbon Contaminants in the Soil: Mechanisms and Impacts. *Journal of Chemistry*, 2021(1), 9823362. <https://doi.org/10.1155/2021/9823362>
- Khan, M. A. I., Biswas, B., Smith, E., Naidu, R., & Megharaj, M. (2018). Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review. *Chemosphere*, 212, 755-767. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.094>
- Kitamoto, D., Morita, T., Fukuoka, T., Konishi, M., & Imura, T. (2009). D. Kitamoto, T. Morita, T. Fukuoka, M. Konishi, T. Imura, in Self-assembling Properties of Glycolipid Biosurfactants and Their Potential Applications. *Curr. Opin. In Colloid and Interface Science*, vol. 14. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14, 315-328. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.05.009>
- Klimek, M., Błońska, E., Kulik, K., Zhussupova, A., & Wrzosek, M. (2024). *Bioferments and Biosurfactants as New Products with Potential Use in the Cosmetic Industry*. <https://www.mdpi.com/2076-3417/14/9/3902>
- Kończak, M., Godlewska, P., Wiśniewska, M., & Oleszczuk, P. (2023). *Chemical properties of soil determine the persistence and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge- or sewage sludge/biomass-derived biochar-amended soils*—ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749122021248?via%3Dihub>
- Kopalle, P., Pothana, S. A., & Maddila, S. (2022). Structural and physicochemical characterization of a rhamnolipid biosurfactant. *Chemical Data Collections*, 41, 100905. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2022.100905>

- Koshlaf, E., Ball, A. S., Koshlaf, E., & Ball, A. S. (2017). Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology*, 3(1), Article microbiol-03-00025. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.1.25>
- Kumar, V., Shahi, S. K., & Singh, S. (2018). Bioremediation: An Eco-sustainable Approach for Restoration of Contaminated Sites. En J. Singh, D. Sharma, G. Kumar, & N. R. Sharma (Eds.), *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development* (pp. 115-136). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0_6
- Kuppusamy, S., Raju, N., Megharaj, M., & Venkateswarlu, K. (2019). *Bioavailability of Total Petroleum Hydrocarbons* | SpringerLink. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-24035-6_4
- Lapworth, D., Stuart, M., Hart, A., Crane, E., & Baran, N. (2011). Emerging Contaminants in Groundwater. *Emerging Contaminants in Groundwater*.
- Liao, X., Liu, Q., Li, Y., Gong, X., & Cao, H. (2019). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from different soil fractions by persulfate oxidation. *Journal of Environmental Sciences*, 78, 239-246. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.10.001>
- Lin, Q., Tan, X., Almatrafi, E., Yang, Y., Wang, W., Luo, H., Qin, F., Zhou, C., Zeng, G., & Zhang, C. (2022). Effects of biochar-based materials on the bioavailability of soil organic pollutants and their biological impacts. *Science of The Total Environment*, 826, 153956. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153956>
- Lindsey, S., Jiménez, M., & Crowley, D. (2018). *Full article: Influence of biochar and compost on phytoremediation of oil-contaminated soil*. https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15226514.2017.1337063?casa_token=bsJ-jzmkDg4AAAAA%3AP2Mw5-6sl1Uj4SHCHh7aNKeEdkWnoJNmql1QNBaSGwKuijzd8yLuuB110IpIJG3K2Z_tH-24vUT5-ak8
- Liu, H., Tan, X., Guo, J., Liang, X., Xie, Q., & Chen, S. (2020). Bioremediation of oil-contaminated soil by combination of soil conditioner and microorganism. *Journal of Soils and Sediments*, 20(4), 2121-2129. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02591-6>
- Liu, Q., Li, Q., Wang, N., Liu, D., Zan, L., Chang, L., Gou, X., & Wang, P. (2018). Bioremediation of petroleum-contaminated soil using aged refuse from landfills. *Waste Management*, 77, 576-585. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.05.010>
- Long, X., Shen, C., He, N., Zhang, G., & Meng, Q. (2017). Enhanced rhamnolipids production via efficient foam-control using stop valve as a foam breaker. *Bioresource Technology*, 224, 536-543. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.072>
- López, H. L., Beache, M. B., Fuentes, Y. M. O., Ángel, E. C. del, Chávez, E. C., & Delgado, J. (2022). Extracto metanólico de *Crotalaria longirostrata*: Identificación de metabolitos secundarios y su

- efecto insecticida. *Scientia Agropecuaria*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2022.007>
- Lotfabad, T. B., Shourian, M., Roostaazad, R., Najafabadi, A. R., Adelzadeh, M. R., & Noghabi, K. A. (2009). An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 69(2), 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.11.018>
- Lu, C., Hong, Y., Liu, J., Gao, Y., Ma, Z., Yang, B., Ling, W., & Waigi, M. G. (2019). A PAH-degrading bacterial community enriched with contaminated agricultural soil and its utility for microbial bioremediation. *Environmental Pollution*, 251, 773-782. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.044>
- Marchant, R., & Banat, I. M. (2012). Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnology Letters*, 34(9), 1597-1605. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0956-x>
- Masih, J., Singhvi, R., Kumar, K., Jain, V. K., & Taneja, A. (2012). Seasonal Variation and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Indoor and Outdoor Air in a Semi Arid Tract of Northern India. *Aerosol and Air Quality Research*, 12(4), 515-525. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2011.11.0192>
- Matta-Chuquisapon, J., Valencia-Bazalar, E., Sevilla-Andrade, C., & Barrón-Pastor, H. J. (2022). Filogenia y resistencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido a los antibióticos en pacientes con cáncer hospitalizados en Perú. *Biomédica*, 42(3), 470-478. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6263>
- McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147-179. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147>
- Medić, A., Lješević, M., Inui, H., Beškoski, V., Kojić, I., Stojanović, K., & Karadžić, I. (2020). Efficient biodegradation of petroleum *n* -alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons by polyextremophilic *Pseudomonas aeruginosa* strain with multidegradative capacity. *RSC Advances*, 10(24), 14060-14070. <https://doi.org/10.1039/C9RA10371F>
- Mohammad Y. Ashfaq, Dana A. Da'na, & Mohammad A. Al-Ghouti. (2022). *Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: A review—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030147972102421X>
- Mulligan, C. N., Yong, R. N., & Gibbs, B. F. (2001). Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *Journal of Hazardous Materials*, 85(1-2), 111-125. [https://doi.org/10.1016/s0304-3894\(01\)00224-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3894(01)00224-2)
- Mulligan, C., Sharma, S., & Mudhoo, A. (2014). *Biosurfactants | Research Trends and Applications | Catherine N. Mulli*. <https://doi.org/10.1201/b16383>

- Muthezhilan, R., Ragul, R., Pushpam, A. C., & Hussain, A. J. (2014). Production and Purification of Biosurfactant from Marine Yeast Isolated from Kelambakkam Salterns. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 11(SE), 59-67. <https://doi.org/10.13005/bbra/1392>
- Naciones Unidas. (2023). *COP28: Las promesas de la industria del petróleo y el gas se quedan cortas para abordar el cambio climático, asegura Guterres* | Noticias ONU. <https://news.un.org/es/story/2023/12/1526152>
- Ñústez Cuartas, D. C., Paredes Cuervo, D., & Cubillos Vargas, J. (2014). Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 37(1), 20-28. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0254-07702014000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Olasanmi, I. O., & Thring, R. W. (2018). The Role of Biosurfactants in the Continued Drive for Environmental Sustainability. *Sustainability*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/su10124817>
- Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2019). *La contaminación del suelo: Una realidad oculta*.
- Ortiz, M., Leung, P. M., Shelley, G., Jirapanjawan, T., Nauer, P. A., Van Goethem, M. W., Bay, S. K., Islam, Z. F., Jordaan, K., Vikram, S., Chown, S. L., Hogg, I. D., Makhalanyane, T. P., Grinter, R., Cowan, D. A., & Greening, C. (2021). Multiple energy sources and metabolic strategies sustain microbial diversity in Antarctic desert soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(45), e2025322118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025322118>
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>
- Pandolfo, E., Barra Caracciolo, A., & Rolando, L. (2023). Recent Advances in Bacterial Degradation of Hydrocarbons. *Water*, 15(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/w15020375>
- Patel, R. J., Patel, A. A., Raval, M. A., Pandya, V., Alexander, A., & Ajazuddin. (2023). Chapter 2—Optimization and characterization of various biosurfactant and application in food industries. En Inamuddin & C. O. Adetunji (Eds.), *Applications of Next Generation Biosurfactants in the Food Sector* (pp. 17-42). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824283-4.00012-5>
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M., & Deka, S. (2017a). *Frontiers | Characterization of Biosurfactant Produced during Degradation of Hydrocarbons Using Crude Oil As Sole Source of Carbon*. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.00279/full>

- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M., & Deka, S. (2017b). *Frontiers | Characterization of Biosurfactant Produced during Degradation of Hydrocarbons Using Crude Oil As Sole Source of Carbon*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00279>
- Perfumo, A., Banat, I.M., Canganella, F., Marchant, R. (2006). Scopus preview—Scopus—Document details—Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. En *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 72, pp. 132-138). <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0234-0>
- Peters, R., Montemagno, C., Shem, L., & Lewis, B. (2009). *Surfactant Screening of Diesel-Contaminated Soil | Hazardous Waste and Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1089/hwm.1992.9.113>
- Petterson, A., Adamsson, M., & Dave, G. (2000). *Toxicity and detoxification of Swedish detergents and softener products—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653500000357>
- Phan, C.-W., abu bakar, N., & Hamzah, A. (2013). A Comparative Study on Biosurfactant Activity of Crude Oil-Degrading Bacteria and Its Correlation to Total Petroleum Hydrocarbon Degradation. *Bioremediation Journal*, 17, 240-251. <https://doi.org/10.1080/10889868.2013.827621>
- Pies, C., Hoffmann, B., Petrowsky, J., Yang, Y., Ternes, T. A., & Hofmann, T. (2008). Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in river bank soils. *Chemosphere*, 72(10), 1594-1601. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.021>
- Pradhan, A., & Bhattacharyya, A. (2017). Quest for an eco-friendly alternative surfactant: Surface and foam characteristics of natural surfactants. *Journal of Cleaner Production*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.013>
- Qin, S., Qi, S., Li, X., Fan, Y., Li, H., Mou, X., & Zhang, Y. (2020). Magnetic solid-phase extraction as a novel method for the prediction of the bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Science of The Total Environment*, 728, 138789. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138789>
- Ramakrishnan, V., Marialouis, X. A., Al-Ansari, M. M., Al-Humaid, L., Santhanam, A., & Obulisamy, P. K. (2022). Multilocus sequence typing and ERIC-PCR fingerprinting of virulent clinical isolates of uropathogenic multidrug resistant *Escherichia coli*. *Journal of King Saud University - Science*, 34(3), 101874. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101874>
- Ramirez, M. I., Arevalo, A. P., Sotomayor, S., & Bailon-Moscoso, N. (2017). Contamination by oil crude extraction – Refinement and their effects on human health. *Environmental Pollution*, 231, 415-425. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.017>
- Rani, M., Weadge, J. T., & Jabaji, S. (2020). Isolation and Characterization of Biosurfactant-Producing Bacteria From Oil Well Batteries With Antimicrobial Activities Against Food-Borne and Plant Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00064>

- Ray, M., Kumar, V., & Banerjee, C. (s. f.). *Investigation of biosurfactants produced by three indigenous bacterial strains, their growth kinetics and their anthracene and fluorene tolerance—ScienceDirect*. Recuperado 8 de octubre de 2024, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651320314585?via%3Dihub>
- Reategui, K. (2017). *HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS DURANTE LA COMBUSTIÓN ESPONTÁNEA DEL CARBÓN*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.10105.52327>
- Rehman, R., Ali, M. I., Ali, N., Badshah, M., Iqbal, M., Jamal, A., & Huang, Z. (2021). Crude oil biodegradation potential of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Meyerozyma* sp. *Journal of Hazardous Materials*, 418, 126276. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126276>
- Ren, X., Zeng, G., Tang, L., Wang, J., Wan, J., Liu, Y., Yu, J., Yi, H., Ye, S., & Deng, R. (2018). Sorption, transport and biodegradation – An insight into bioavailability of persistent organic pollutants in soil. *Science of The Total Environment*, 610-611, 1154-1163. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.089>
- Rios, K. J. E., Valdelamar, M. A. M., & Jaramillo-Colorado, B. E. (2023). Contaminación por hidrocarburos aromaticos policiclicos en sedimentos y especies marinas: Revisión. *Ciencia en Desarrollo*, 14(2), Article 2. <https://doi.org/10.19053/01217488.v14.n2.2023.14760>
- Roy, A., Dutta, A., Pal, S., Gupta, A., Sarkar, J., Chatterjee, A., Saha, A., Sarkar, P., Sar, P., & Kazy, S. K. (2018). Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresource Technology*, 253, 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.004>
- Ruehlmann, J., & Körschens, M. (2020). *Soil particle density as affected by soil texture and soil organic matter: 2. Predicting the effect of the mineral composition of particle-size fractions—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016706120306455?via%3Dihub>
- Sales da Silva, I. G., Gomes de Almeida, F. C., Padilha da Rocha e Silva, N. M., Casazza, A. A., Converti, A., & Asfora Sarubbo, L. (2020). Soil Bioremediation: Overview of Technologies and Trends. *Energies*, 13(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/en13184664>
- Samsu, Z., `Asyiqin, Jeffry, F. N., & Azizan, W. N. A. N. W. A. R. (2020a). Isolation and screening of potential biosurfactant-producing bacteria from used engine oil-contaminated soil. *Materials Today: Proceedings*, 31, A67-A71. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.438>
- Samsu, Z., `Asyiqin, Jeffry, F. N., & Azizan, W. N. A. N. W. A. R. (2020b). Isolation and screening of potential biosurfactant-producing bacteria from used engine oil-contaminated soil. *Materials Today: Proceedings*, 31, A67-A71. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.438>
- Satpute, S., Kulkarni, G., Banpurkar, A., Banat, I., Mone, N., Patil, R., & Cameotra, S. (2016). *Biosurfactant/s from Lactobacilli species: Properties, challenges and potential biomedical*

- applications—Satpute—2016—Journal of Basic Microbiology—Wiley Online Library.*
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.201600143>
- Shaban, S. M., Kang, J., & Kim, D.-H. (2020). Surfactants: Recent advances and their applications. *Composites Communications*, 22, 100537. <https://doi.org/10.1016/j.coco.2020.100537>
- Shao, Z. (2011). Trehalolipids. En G. Soberón-Chávez (Ed.), *Biosurfactants: From Genes to Applications* (pp. 121-143). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5_5
- Shi, J., Chen, Y., Liu, X., Ran, Y., & Li, D. (2020). *Rhamnolipid production from waste cooking oil using newly isolated halotolerant Pseudomonas aeruginosa M4.*
<https://doi.org/10.1101/2020.03.09.983478>
- Siebielec, S., Marzec, A., Siebielec, G., Ukalska, A., Koziel, M., & Urbaniak, M. (2023). *Microbial Community Response to Various Types of Exogenous Organic Matter Applied to Soil.*
<https://www.mdpi.com/1422-0067/24/19/14559>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Soberón-Chávez, G., González-Valdez, A., Soto-Aceves, M. P., & Cocotl-Yañez, M. (2021). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: From molecular genetics to the market. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 136-146. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13700>
- Souza, E. C., Vessoni-Penna, T. C., & de Souza Oliveira, R. P. (2014). Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89, 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.007>
- Stancu, M. M. (2022). ALIPHATIC HYDROCARBONS BIODEGRADATION BY A *Pseudomonas* STRAIN. *AgroLife Scientific Journal*, 11(2), 183-190. <https://doi.org/10.17930/AGL2022224>
- Striebich, R. C., Smart, C. E., Gunasekera, T. S., Mueller, S. S., Strobel, E. M., McNichols, B. W., & Ruiz, O. N. (2014). Characterization of the F-76 diesel and Jet-A aviation fuel hydrocarbon degradation profiles of *Pseudomonas aeruginosa* and *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 93, 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.04.024>
- Su, W.-T., Wu, B.-S., & Chen, W.-J. (2011). Characterization and biodegradation of motor oil by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* and optimizing medium constituents. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(5), 689-695. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2011.01.002>
- Suganthi, S. H., Murshid, S., Sriram, S., & Ramani, K. (2018). Enhanced biodegradation of hydrocarbons in petroleum tank bottom oil sludge and characterization of biocatalysts and biosurfactants. *Journal of Environmental Management*, 220, 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.120>

- Sun, W., Cao, W., Jiang, M., Saren, G., Liu, J., Cao, J., Ali, I., Yu, X., Peng, C., & Naz, I. (2018a). Isolation and characterization of biosurfactant-producing and diesel oil degrading *Pseudomonas* sp. CQ2 from Changqing oil field, China. *RSC Advances*, 8(69), 39710-39720. <https://doi.org/10.1039/C8RA07721E>
- Sun, W., Cao, W., Jiang, M., Saren, G., Liu, J., Cao, J., Ali, I., Yu, X., Peng, C., & Naz, I. (2018b). Isolation and characterization of biosurfactant-producing and diesel oil degrading *Pseudomonas* sp. CQ2 from Changqing oil field, China. *RSC Advances*, 8(69), 39710-39720. <https://doi.org/10.1039/C8RA07721E>
- Suwardi, A., Ratnaningsih, R., & Rinanti, A. (2021). Bioremediation of petroleum hydrocarbon by mixed bacteria culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Brevibacterium* sp. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1098(5), 052036. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1098/5/052036>
- Tahzibi, A., Kamal, F., & Assadi, M. M. (2004). *Improved Production of Rhamnolipids by a Pseudomonas aeruginosa Mutant*.
- Talvenmäki, H., Lallukka, N., Survo, S., & Romantschuk, M. (2019). Fenton's reaction-based chemical oxidation in suboptimal conditions can lead to mobilization of oil hydrocarbons but also contribute to the total removal of volatile compounds. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(33), 34670. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06547-3>
- Tavares, J., Alves, L., Silva, T. P., & Paixão, S. M. (2021). Design and validation of an expeditious analytical method to quantify the emulsifying activity during biosurfactants/bioemulsifiers production. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208, 112111. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112111>
- Thakur, P., Saini, N. K., Thakur, V. K., Gupta, V. K., Saini, R. V., & Saini, A. K. (2021). Rhamnolipid the Glycolipid Biosurfactant: Emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01497-9>
- Uyar, E., & Özgür, S. (2021). *Isolation, screening and molecular characterization of biosurfactant producing bacteria from soil samples of auto repair shops | Archives of Microbiology*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-021-02483-4>
- van Beilen, J. B., & Funhoff, E. G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 13-21. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0748-0>
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 71-83. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.006>

- Varjani, S., Joshi, & Kumar, S. (2017). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Petroleum Oil Industry Activities: Effect on Human Health and Their Biodegradation* | SpringerLink. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-7413-4_9
- Vinardell, M. P., & Infante, M. R. (1999). The relationship between the chain length of non-ionic surfactants and their hemolytic action on human erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 124(2), 117-120. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00057-2](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00057-2)
- Vizuete-García, R. A., Pascual Barrera, A. E., Taco-Taco, C. W., & Morales-Padilla, M. M. (2020). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a base de bacterias utilizadas como bioproductos. *Revista Lasallista de investigación*, 17(1), 177-187. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7921995>
- Wang, J.-D., Qu, C.-T., & Song, S.-F. (2021). Temperature-induced changes in the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* during petroleum hydrocarbon degradation. *Archives of Microbiology*, 203(5), 2463-2473. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02211-y>
- Wang, M., Jia, S., Lee, S. H., Chow, A., & Fang, M. (2021). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor environments are still imposing carcinogenic risk. *Journal of Hazardous Materials*, 409, 124531. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124531>
- Wang, S., & Mulligan, C. N. (2004). Rhamnolipid Foam Enhanced Remediation of Cadmium and Nickel Contaminated Soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 157(1-4), 315-330. <https://doi.org/10.1023/B:WATE.0000038904.91977.f0>
- Wang, Y., Yu, Q., Cai, M., Zhou, F., & Liu, W. (2018). Halide-free PN ionic liquids surfactants as additives for enhancing tribological performance of water-based liquid. *Tribology International*, 128, 190-196. <https://doi.org/10.1016/j.triboint.2018.07.018>
- Winterburn, J. B., & Martin, P. J. (2012). Foam mitigation and exploitation in biosurfactant production. *Biotechnology Letters*, 34(2), 187-195. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0782-6>
- Yan, T., Zhang, Z., Zhang, Z., Wang, W., Li, D., Zhang, T., & Zhiping, Z. (2024). *Applying Hydrochar Affects Soil Carbon Dynamics by Altering the Characteristics of Soil Aggregates and Microbes*. <https://www.mdpi.com/2073-4395/14/5/1015>
- Zhang, F., Li, S., Zhang, Q., Liu, J., Zeng, S., Liu, M., & Sun, D. (2019). Adsorption of different types of surfactants on graphene oxide. *Journal of Molecular Liquids*, 276, 338-346. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.12.009>
- Zhao, M., Lv, W., Li, Y., Dai, C., Wang, X., Zhou, H., Zou, C., Gao, M., Zhang, Y., & Wu, Y. (2018). Study on the synergy between silica nanoparticles and surfactants for enhanced oil recovery during spontaneous imbibition. *Journal of Molecular Liquids*, 261, 373-378. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.04.034>
- Zhu, Q., Fan, Z., Zeng, L., Li, Ch., Ye, Ch., & Zheng, R. (2024). *Effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on microbial community structure and function in lake-terrestrial ecotones: A simulation*

experiment—ScienceDirect.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186424000701?via%3Dihub>

6. Anexos

Anexo 1

Coordenadas de los puntos de muestreo.

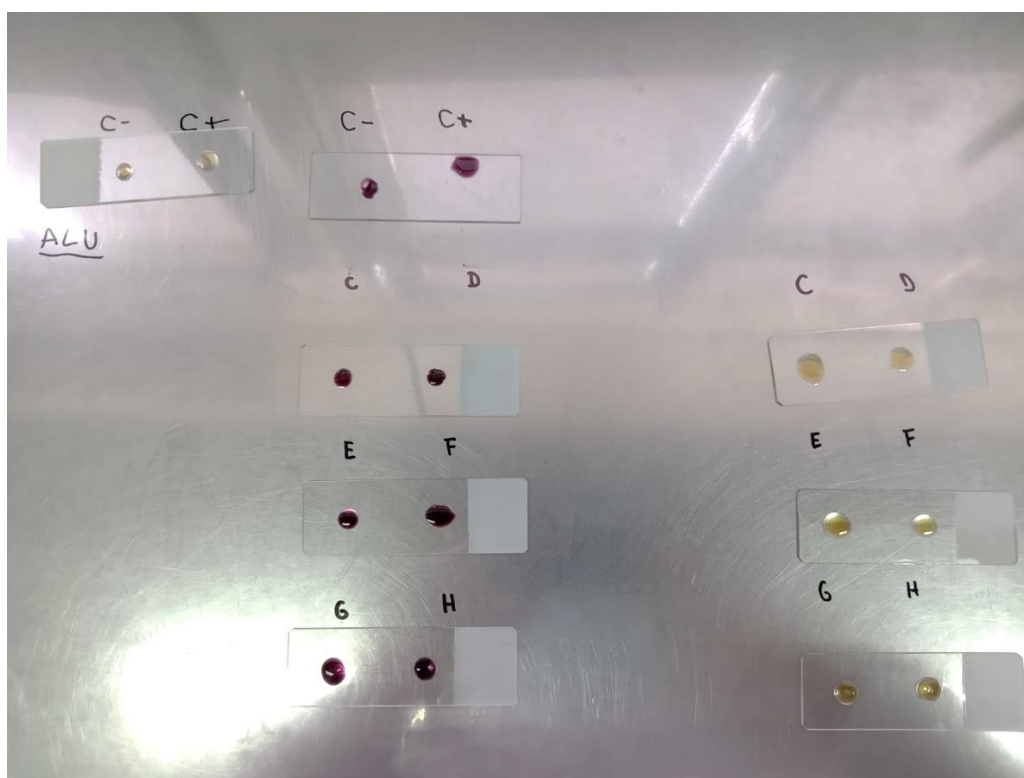
N° Muestra	Fecha	Nombre	Cantón	Coordenadas
1	5/08/24	Lubricadora Mat Zoe	Ambato	1°18'04.4"S 78°37'59.0"W
2	5/08/24	Lubricadora Mat Zoe	Ambato	1°18'04.4"S 78°37'59.0"W
3	5/08/24	Lubricadora Mat Zoe	Ambato	1°18'04.4"S 78°37'59.0"W
1	5/08/24	Lubricadora Rodríguez	Ambato	1°17'02.6"S 78°36'50.6"W
2	5/08/24	Lubricadora Rodríguez	Ambato	1°17'02.6"S 78°36'50.6"W
3	5/08/24	Lubricadora Rodríguez	Ambato	1°17'02.6"S 78°36'50.6"W
1	5/08/24	Lubricadora Solís	Ambato	1°16'14.3"S 78°37'08.8"W
2	5/08/24	Lubricadora Solís	Ambato	1°16'14.3"S 78°37'08.8"W
1	5/08/24	Lubricadora Zurita	Ambato	1°17'02.6"S 78°36'50.6"W
1	5/08/24	Lubricadora los Andes	Ambato	1°18'04.4"S 78°37'59.0"W

Nota: Indica la ubicación exacta de cada una de las lubricadoras de Ambato.



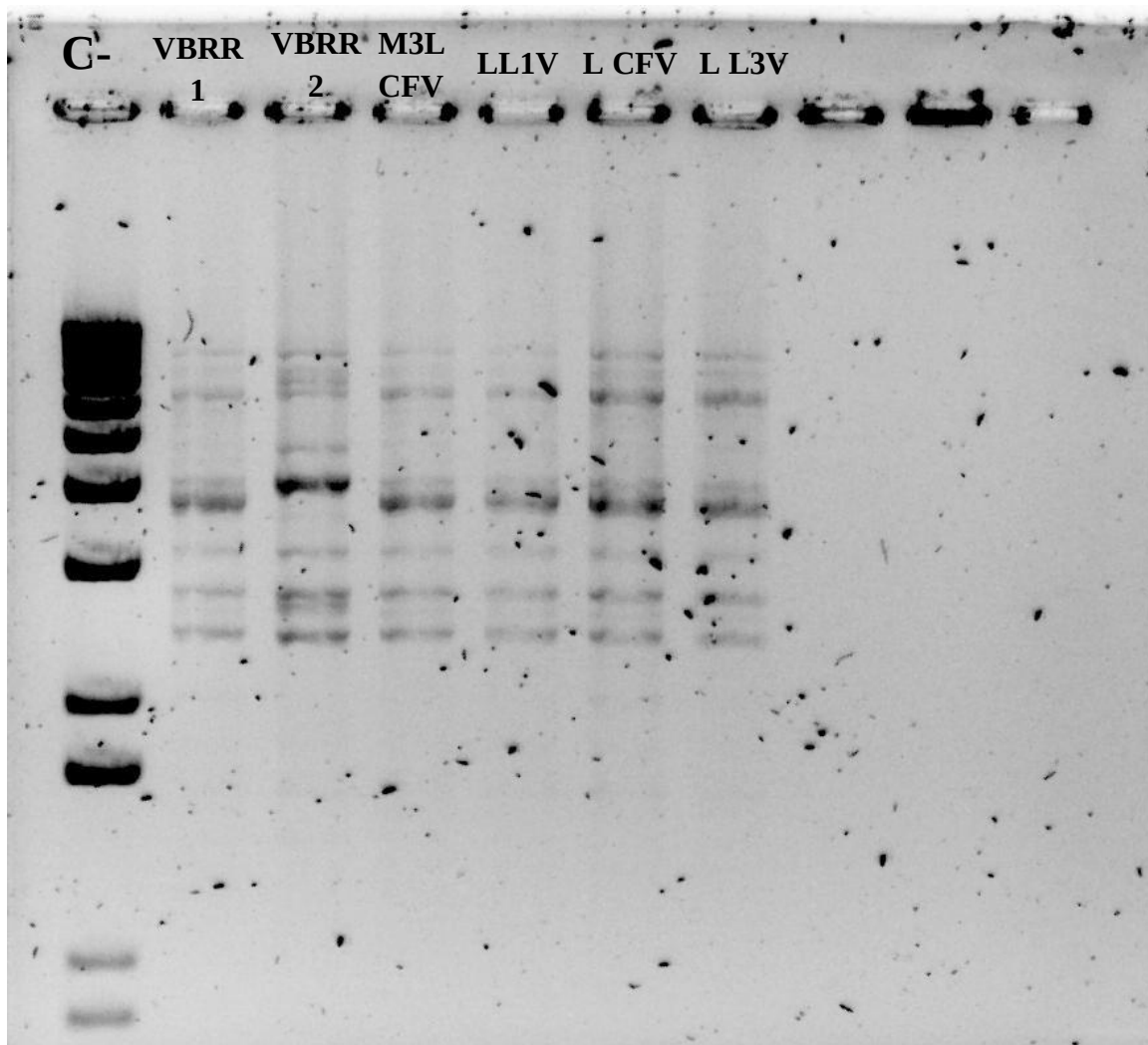
Anexo 2. Representación de los controles positivo y negativo del ensayo del colapso de la gota por caída.

Nota. El control (-) contiene agua destilada sobre la gota de aceite (A) y como control (+) a jabón diluido en agua sobre la gota de aceite (B).



Anexo 3. Ensayo de colapso de la gota por caída con aceite comestible con colorante (morado) y aceite lubricante usado (ALU)(amarillo).

Nota. Se muestran gotas perfectas debido a que son resultados positivos todos los ejemplares y para corroborar los resultados se realizaron las evaluaciones con dos clases de aceites.



Anexo 4. Gel de electroforesis con muestras positivas para el gen ERIC PCR.

Anexo 5

Método gravimétrico de los 7 días sin sustrato.

MUESTRA	REPETICIÓN	PESO INICIAL	PESO FINAL	DIFERENCIA
VBRR 1	1	145,3697	145,7005	0,3308
	2	145,2656	145,5841	0,3185
	3	145,2897	145,6251	0,3354
VBRR 2	1	145,8371	146,1886	0,3515
	2	146,5452	146,8908	0,3456
	3	146,2485	146,6085	0,36
L CFV	1	145,7147	146,0427	0,328
	2	146,8723	147,1908	0,3185
	3	146,5685	146,8894	0,3209
L L3 verde	1	146,1824	147,2335	1,0511
	2	145,4235	146,5756	1,1521
	3	145,2568	146,262	1,0052
L L1 verde	1	145,4251	146,1592	0,7341
	2	146,1285	146,857	0,7285
	3	145,4526	146,214	0,7614
M3 L CFV	1	146,6631	147,466	0,8029
	2	146,2548	147,0526	0,7978
	3	145,9652	146,7854	0,8202

Anexo 6

Método gravimétrico de los 14 días sin sustrato.

MUESTRA	REPETICIÓN	PESO INICIAL	PESO FINAL	DIFERENCIA
VBRR 1	1	42,1163	42,3950	0,2787
	2	145,2595	145,5167	0,2572
	3	145,7147	145,9961	0,2814
VBRR 2	1	48,7295	48,9318	0,2023
	2	145,2568	145,4853	0,2285
	3	146,6631	146,8796	0,2165
L CFV	1	48,1878	48,3949	0,2071
	2	146,2548	146,4644	0,2096
	3	146,9652	147,1947	0,2295
L L3 verde	1	48,2428	49,1990	0,9562

	2	145,2656	146,1941	0,9285
	3	145,2897	146,2322	0,9425
L L1 verde	1	49,5975	50,3110	0,7135
	2	146,8723	147,5988	0,7265
	3	146,2541	146,9737	0,7196
M3 L CFV	1	50,355	50,7565	0,4015
	2	146,8371	147,2496	0,4125
	3	146,5452	146,9817	0,4365

Anexo 7

Método gravimétrico de los 7 días con sustrato.

MUESTRA	REPETICIÓN	PESO INICIAL	PESO FINAL	DIFERENCIA
VBRR 1	1	146,3615	146,8028	0,4413
	2	146,2441	146,6953	0,4512
	3	146,5991	147,0606	0,4615
VBRR 2	1	146,3645	146,6862	0,3217
	2	146,2939	146,6164	0,3225
	3	146,2034	146,5385	0,3351
L CFV	1	146,1956	146,8768	0,6812
	2	31,0558	31,7382	0,6824
	3	146,2995	146,9993	0,6998
L L3 verde	1	145,2634	146,0347	0,7713
	2	145,3591	146,1483	0,7892
	3	101,7351	102,5122	0,7771
L L1 verde	1	30,8923	31,4069	0,5146
	2	30,8738	31,4033	0,5295
	3	145,5848	146,1162	0,5314
M3 L CFV	1	145,2245	145,8393	0,6148
	2	145,8844	146,492	0,6076
	3	32,4643	33,0655	0,6012

Anexo 8

Método gravimétrico de los 14 días con sustrato.

MUESTRA	REPETICIÓN	PESO INICIAL	PESO FINAL	DIFERENCIA
VBRR 1	1	42,1163	41,8376	0,2787
	2	32,4644	32,1945	0,2699
	3	31,0582	30,7826	0,2756
VBRR 2	1	48,7295	48,5272	0,2023
	2	146,5978	146,3869	0,2109
	3	145,5735	145,3481	0,2254
L CFV	1	48,1878	47,9633	0,2245
	2	145,339	145,1212	0,2178
	3	146,2306	146,0004	0,2302
L L3 verde	1	48,2428	48,1221	0,1207
	2	146,2803	146,1632	0,1171
	3	145,8742	145,7429	0,1313
L L1 verde	1	49,5975	49,208	0,3895
	2	145,3831	145,0127	0,3704
	3	146,2931	145,9119	0,3812
M3 L CFV	1	50,355	49,9535	0,4015
	2	145,409	144,9866	0,4224
	3	146,1991	145,7795	0,4196

A un nivel de significancia $\alpha=0,05$

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso	72	1,00	1,00	4,15

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,32	25	0,17	2969,22	<0,0001
Tiempo	2,43	1	2,43	41850,84	<0,0001
Medio	0,17	1	0,17	2857,88	<0,0001
Tipo de bacteria	0,35	5	0,07	1207,96	<0,0001
Réplica	3,7E-04	2	1,9E-04	3,19	0,0506
Tiempo*Tipo de bacteria	0,35	5	0,07	1207,96	<0,0001
Tiempo*Medio	0,17	1	0,17	2857,88	<0,0001
Tipo de bacteria*Medio	0,42	5	0,08	1457,79	<0,0001
Tiempo*Tipo de bacteria*Medio	0,42	5	0,08	1457,79	<0,0001
Error	2,7E-03	46	5,8E-05		
Total	4,32	71			

Anexo 9. Análisis de varianza (ANOVA).

En vista de que el valor p, es muy pequeño se rechaza H_0 y se concluye que el porcentaje de biodegradación del aceite si se ve influenciado por los días de incubación (0 y 14 días), las diferentes cepas bacterianas y la presencia o ausencia de sustrato en el medio de cultivo.

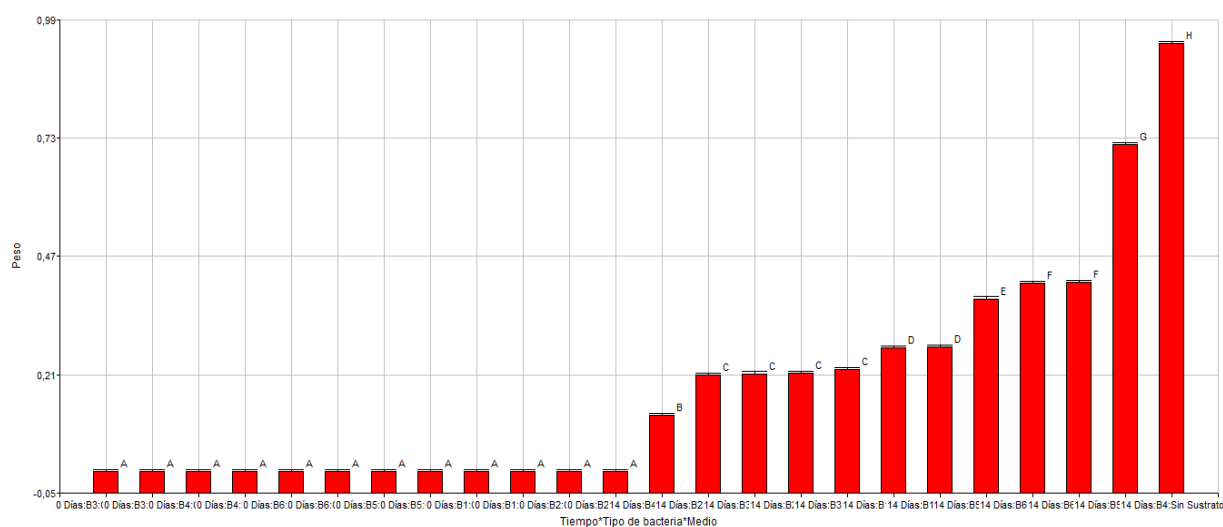
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02406

Error: 0,0001 gl: 46

Tiempo	Tipo de bacteria	Medio	Medias	n	E.E.	
0 Días	B3	Con Sustrato	0,00	3	4,4E-03	A
0 Días	B3	Sin Sustrato	0,00	3	4,4E-03	A
0 Días	B4	Con Sustrato	0,00	3	4,4E-03	A
0 Días	B4	Sin Sustrato	0,00	3	4,4E-03	A
0 Días	B6	Sin Sustrato	0,00	3	4,4E-03	A
0 Días	B6	Con Sustrato	0,00	3	4,4E-03	A
0 Días	B5	Sin Sustrato	0,00	3	4,4E-03	A
0 Días	B5	Con Sustrato	0,00	3	4,4E-03	A
0 Días	B1	Con Sustrato	0,00	3	4,4E-03	A
0 Días	B1	Sin Sustrato	0,00	3	4,4E-03	A
0 Días	B2	Con Sustrato	0,00	3	4,4E-03	A
0 Días	B2	Sin Sustrato	0,00	3	4,4E-03	A
14 Días	B4	Con Sustrato	0,12	3	4,4E-03	B
14 Días	B2	Con Sustrato	0,21	3	4,4E-03	C
14 Días	B3	Sin Sustrato	0,22	3	4,4E-03	C
14 Días	B2	Sin Sustrato	0,22	3	4,4E-03	C
14 Días	B3	Con Sustrato	0,22	3	4,4E-03	C
14 Días	B1	Sin Sustrato	0,27	3	4,4E-03	D
14 Días	B1	Con Sustrato	0,27	3	4,4E-03	D
14 Días	B5	Con Sustrato	0,38	3	4,4E-03	E
14 Días	B6	Con Sustrato	0,41	3	4,4E-03	F
14 Días	B6	Sin Sustrato	0,42	3	4,4E-03	F
14 Días	B5	Sin Sustrato	0,72	3	4,4E-03	G
14 Días	B4	Sin Sustrato	0,94	3	4,4E-03	H

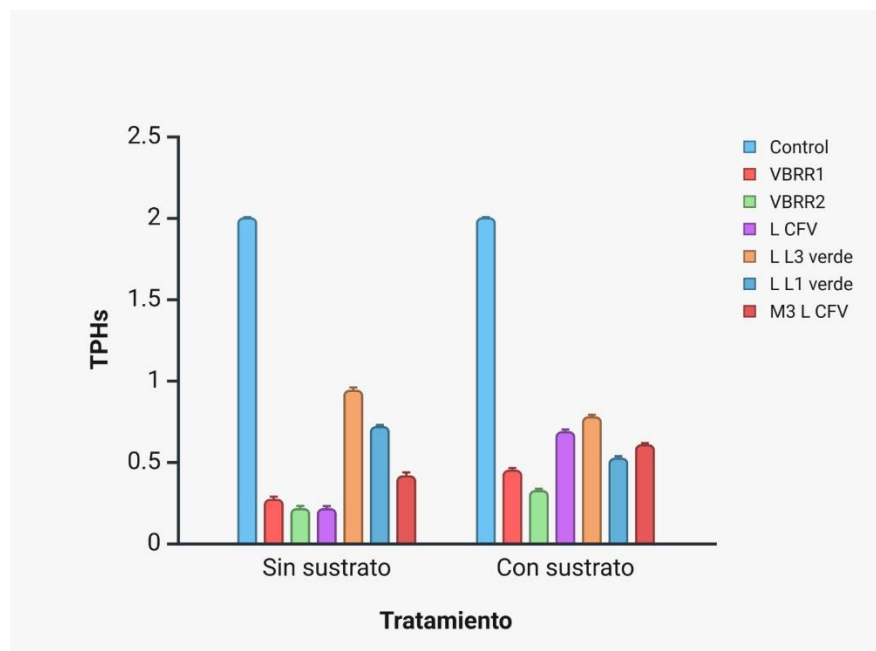
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 10. Indica las interacciones de los tres factores evaluados de Tiempo*Tipo de bacteria*Medio de cultivo en los días 0 y 14 días.



Anexo 11. Interacciones de los tres factores evaluados de Tiempo, Tipo de bacteria, y medio de cultivo.

En el **Anexo 11**, las barras representan los resultados de comparaciones estadísticas realizadas mediante la prueba de Tukey, donde barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes. Al inicio del experimento, las barras correspondientes a "0 días" presentan valores cercanos o iguales a 0, lo que indica que no hubo incremento en el peso. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo, hasta el día 14, se observa un incremento significativo, especialmente en la barra más alta. Esta última refleja el efecto combinado de las cepas bacterianas y el medio de cultivo, destacándose las condiciones sin sustrato. En particular, la combinación de la cepa bacteriana LL3Verde y el medio sin sustrato alcanza los valores más altos, evidenciando que ciertas bacterias y medios favorecen una biodegradación más efectiva.



Anexo 12. Indica las interacciones del medio de cultivo con y sin sustrato en el ensayo gravimétrico.

La presencia de sustrato parece aumentar los valores de TPHs en todos los grupos, con la excepción del grupo L L1 Verde, lo que sugiere que el sustrato juega un papel importante en el proceso que se está midiendo, además, poseen una gran variabilidad ya que indica que los tratamientos tienen un impacto significativo en dichos valores como se muestra en el **Anexo 12**.