

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



**Aislamiento y caracterización de bacterias marinas cultivables  
degradadoras de hidrocarburos del área de extracción y  
perforación de petróleo Lote Z-1, Tumbes- Perú.**

**Tesis para optar el grado académico de Doctor  
en Ciencias Ambientales.**

**Autor: Robert Peralta Otero**

**Tumbes, 2024**

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

## ESCUELA DE POSGRADO

### DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



### **Aislamiento y caracterización de bacterias marinas cultivables degradadoras de hidrocarburos del área de extracción y perforación de petróleo Lote Z-1, Tumbes- Perú.**

**Tesis aprobada en forma y estilo por:**

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón

\_\_\_\_\_  
PRESIDENTE

Dra. Eneida Graciela Vieyra Peña

\_\_\_\_\_  
SECRETARIA

Dr. Miguel Antonio Puestas Chully

\_\_\_\_\_  
VOCAL

Tumbes, 2024

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

## ESCUELA DE POSGRADO

### DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



#### **Aislamiento y caracterización de bacterias marinas cultivables degradadoras de hidrocarburos del área de extracción y perforación de petróleo Lote Z-1, Tumbes- Perú.**

**Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido  
y forma**

Mg. Robert Peralta Otero

  
AUTOR

Dra. Tessy Peralta Ortiz

  
ASESORA

Dr. Alberto Ordinola Zapata

  
COASESOR

Tumbes, 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES  
Licenciada  
Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDU/CD  
**ESCUELA DE POSGRADO**  
Tumbes – Perú

“Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho”

**ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS**

En Tumbes, a los catorce días del mes de marzo del dos mil veinticuatro, siendo las 11 horas y diez minutos, en el aula n° 2 de la Escuela de Posgrado, se reunieron el jurado calificador de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes designado con Resolución N° 212- 2022 /UNTUMBES-EPG-D, de fecha 29 de diciembre de 2022. DR. AUBERTO HIDALGO MOGOLLÓN (Presidente), DRA. ENEDIA GRACIELA VIEYRA PEÑA (secretaria), además del DR.: MIGUEL ANTONIO PUESCAS CHULLY (Vocal), y como Asesor a la DRA.: TESSY PERALTA ORTIZ. y como Coasesor al Dr. ALBERTO ORDINOLA ZAPATA.

Se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de tesis titulada: “AISLAMIENTO Y CATACTERIZACIÓN DE BACTERIAS MARINAS CULTIVABLES DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS DEL ÁREA DE EXTRACCIÓN Y PERFORACIÓN DE PETRÓLEO LOTE Z-1, TUMBES-PERÚ” para optar el grado académico de **DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**, presentado por el:

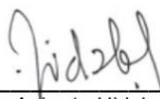
**Doctorando: ROBERT PERALTA OTERO**

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del (la) sustentante y después de la deliberación el jurado según el artículo N° 65 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara al: Maestrando, aprobado con calificativo de **MUY BUENA**

En consecuencia, queda **APTO**, para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del grado académico de Doctor en Ciencias Ambientales, de conformidad con lo estipulado en la ley universitaria N° 30220, el estatuto, Reglamento General, Reglamento general de grados títulos y reglamento de tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 12 horas y 15 minutos, del mismo día, se dio por concluido la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta en presencia de público asistente.

Tumbes, 14 de marzo de 2024.

  
\_\_\_\_\_  
**DR.: Auberto Hidalgo Mogollón**  
DNI N°: 00250460  
ORCID N° 0000-0003-2921-4523  
**PRESIDENTE**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA.: Enedia Graciela Vieyra Peña**  
DNI N° 00217076  
ORCID N° 0000-0001-6541-7075  
**SECRETARIA**

  
\_\_\_\_\_  
**DR.: Miguel Antonio Puescas Chully**  
DNI N°: 02660522  
ORCID N° 0000-0003-1979-9572  
**VOCAL**

C.c.  
Archivo (Director EPG 1).  
Jurado de Tesis (03), Asesor (1), Coasesor (1), Interesado (4)

## DEDICATORIA

A Jehová Dios por acompañarme y guiarme a lo largo de mis estudios, por ser mi fortaleza en los momentos difíciles que me tocó vivir y por darme una vida nueva llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mis padres por los valores que han inculcado en mí, y por darme la oportunidad de vivir. Sobre todo, por ser un ejemplo de vida.

A mis hermanos por ser el eslabón de mi vida y mantener la unidad de la familia.

A mi esposa e hijos por su gran comprensión ya que para realizar esta investigación sacrificamos demasiado tiempo del núcleo familiar.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de Tumbes por el financiamiento oportuno del Proyecto de Investigación “Producción de un biorremediador en base a bacterias nativas degradadoras de hidrocarburos presentes en el mar y manglar de Tumbes”. En el cual se desarrolló el trabajo de la presente Tesis.

A mi asesora y coasesor Dra. Tessy Peralta Ortiz y Dr. Alberto Ordinola Zapata, por su valioso y desinteresado apoyo en la elaboración, ejecución y redacción de la presente tesis.

A los miembros de mi jurado: Dr. Auberto Hidalgo Mogollón, Dra. Eneida Graciela Vieyra Peña, y Dr. Miguel Antonio Puestas Chully, por sus valiosos aportes y sugerencias que me permitieron mejorar la presente tesis.

A todos los integrantes y colaboradores del Proyecto de investigación “Producción de un biorremediador en base a bacterias nativas degradadoras de hidrocarburos presentes en el mar y manglar de Tumbes”. Equipo representado por el Dr. Auberto Hidalgo Mogollón, Dra. Tessy Peralta Ortiz, Dr. Alberto Ordinola Zapata, Dra. Eneida Graciela Vieyra Peña, Dr. Héctor Alfredo Sánchez Suarez, Dr. Oscar Mendoza Neyra, Mg. Beder Esmith Ramírez Segura. A los colaboradores Mg. Erick Suarez Peña, Técnico Peter Baca Benites, Técnico Pedro Masías Ramírez, Mg. Yeni Emperatriz Seminario Yamunaqué, Ing. Nicole Alessandra Vergara Alfaro e Ing. Paul Campaña Maza.

# 2024.02.25. Tesis Doctorado. Robert Peralta Otero

*por* Robert Peralta Otero



---

Dra. Tessy Peralta Ortiz  
<https://orcid.org/0000-0001-5907-7713>  
Docente Asesora

**Fecha de entrega:** 25-feb-2024 09:58a.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2258521405

**Nombre del archivo:** 5\_Informe\_final\_de\_la\_Tesis\_de\_Robert\_Peralta\_revisado\_AOZ.docx (3.76M)

**Total de palabras:** 13005

**Total de caracteres:** 71805

## 2024.02.25. Tesis Doctorado. Robert Peralta Otero

### INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>17</b> %	<b>15</b> %	<b>5</b> %	<b>10</b> %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

### FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>Submitted to Universidad Nacional de Tumbes</b> Trabajo del estudiante	<b>5</b> %
<b>2</b>	<b>erp.untumbes.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>3</b> %
<b>3</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>2</b> %
<b>4</b>	<b>repositorio.untumbes.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>5</b>	<b>repositorio.ucv.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>6</b>	<b>www.untumbes.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>7</b>	<b>1library.co</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>8</b>	<b>ria.utn.edu.ar</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>9</b>	<b>repositorio.espam.edu.ec</b> Fuente de Internet	

  
Dra. Tussy Peralta Ortiz  
<https://orcid.org/0000-0001-5907-7713>  
Docente Asesora

		<1 %
10	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	<1 %
11	Submitted to Universidad Nacional Abierta y a Distancia, UNAD,UNAD Trabajo del estudiante	<1 %
12	colposdigital.colpos.mx:8080 Fuente de Internet	<1 %
13	www.portalfio.org Fuente de Internet	<1 %
14	repositorio.uach.mx Fuente de Internet	<1 %
15	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
16	microecobiot.wordpress.com Fuente de Internet	<1 %
17	digibug.ugr.es Fuente de Internet	<1 %
18	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
19	repobib.ubiobio.cl Fuente de Internet	<1 %
20	repositorio.uct.edu.pe Fuente de Internet	<1 %

  
 Dra. Tussy Peralta Ortiz  
<https://orcid.org/0000-0001-5907-7713>  
 Docente Asesora

		<1 %
21	<a href="http://ejournal.usm.my">ejournal.usm.my</a> Fuente de Internet	<1 %
22	Karl-Heinz Schleifer. "Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5)", <i>Systematic Bacteriology</i> , 2009 Publicación	<1 %
23	<a href="http://ecommons.usask.ca">ecommons.usask.ca</a> Fuente de Internet	<1 %
24	<a href="http://repositorio.lamolina.edu.pe">repositorio.lamolina.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
25	<a href="http://repositorio.unc.edu.pe">repositorio.unc.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
26	<a href="http://accesoabierto.uh.cu">accesoabierto.uh.cu</a> Fuente de Internet	<1 %
27	<a href="http://repositorio.unap.edu.pe">repositorio.unap.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
28	<a href="http://www.coursehero.com">www.coursehero.com</a> Fuente de Internet	<1 %
29	Abdolkazem Neisi, Sahand Jorfi, Gholamreza Goudarzi, Mohammad Roayaei Ardakani, Parviz Mahmoudi, Afshin Takdastan. "Biodegradation potential of native	<1 %

  
 Dra. Tessa Peralta Ortiz  
<https://orcid.org/0000-0001-5907-7713>  
 Docente Asesora

hydrocarbon degrading bacteria by using bio-stimulation on crude oil in soils of Khuzestan province (Abadan, Ahvaz and Andimeshk) – Iran", *Bioremediation Journal*, 2022

Publicación

---

30 Armando C. F. Dias. "Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 03/14/2009 <1 %

Publicación

---

31 VALLADARES ROBLES LOURDES CYNTHIA. "ITS del Proyecto para la Mejora Tecnológica al Sistema de Respuesta Contra Derrames de Hidrocarburos en el Yacimiento Corvina – Lote Z1-IGA0016648", R.D. N° 094-2017-SENACE/DCA , 2022 <1 %

Publicación

---

32 [bdigital.unal.edu.co](http://bdigital.unal.edu.co) <1 %

Fuente de Internet

---

33 [repositorioinstitucional.uabc.mx](http://repositorioinstitucional.uabc.mx) <1 %

Fuente de Internet

---

34 [www.sciencepub.net](http://www.sciencepub.net) <1 %

Fuente de Internet

---

35 [www.scribd.com](http://www.scribd.com) <1 %

Fuente de Internet

---

  
Dra. Tesy Peralta Ortiz  
<https://orcid.org/0000-0001-5907-7713>  
Docente Asesora

**36** Kaczorek, Ewa, Karina Sałek, Urszula Guzik, and Beata Dudzińska-Bajorek. "Cell surface properties and fatty acids composition of *Stenotrophomonas maltophilia* under the influence of hydrophobic compounds and surfactants", *New Biotechnology*, 2013.

Publicación

<1 %

**37** Submitted to Universidad Distrital FJDC

Trabajo del estudiante

<1 %

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo

  
Dra. Tussy Peralta Ortiz  
<https://orcid.org/0000-0001-5907-7713>  
Docente Asesora

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	xviii
ABSTRACT .....	xix
I. INTRODUCCIÓN.....	20
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA .....	23
2.1 Bases teóricas.....	23
2.1.1 Bacterias.....	23
2.1.2 Características de las bacterias.....	23
2.1.3 Características microscópicas y macroscópicas.....	23
2.1.4 Método molecular de identificación bacteriana .....	24
2.1.5 Sustancias que integran las fracciones del petróleo.....	24
2.1.6 Hidrocarburos totales del petróleo (HTP) .....	25
2.1.7 Impacto de los hidrocarburos de petróleo en el medio marino .....	25
2.1.8 Biorremediación.....	25
2.2 Antecedentes .....	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
3.1 Lugar y periodo de ejecución de la investigación .....	29
3.2 Tipo y diseño de investigación .....	29
3.3 Población y muestra de estudio .....	30
3.4 Recolección de las muestras. ....	31
3.5 Siembra de las muestras.....	32
3.6 Caracterización fenotípica de las colonias bacterianas.....	33
3.7 Purificación de las colonias aisladas.....	33
3.8 Tinción de Gram.....	33
3.9 Pruebas de catalasa y oxidasa .....	34
3.9.1 Prueba de catalasa.....	34
3.9.2 Prueba de oxidasa.....	34
3.10 Extracción de ADN.....	34
3.11 Identificación molecular de las cepas aisladas .....	35
3.12 Detección de genes codificadores de oxigenasas .....	36
3.13 Visualización de los amplicones .....	38
3.14 Ensayos de biorremediación.....	38

3.14.1	Biorremediación <i>in vitro</i> .....	38
3.14.2.	Biorremediación a mayor escala con bacterias del agua de mar ..	39
3.15.	Procesamiento y análisis de datos.....	39
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	40
4.1.	Aislamiento y purificación de cepas bacterianas .....	40
4.2.	Caracterización de colonias bacterianas.....	41
4.3	Caracterización de Gram, pruebas de catalasa y oxidasa .....	42
4.4	Detección de genes oxigenasas en cepas bacterianas.....	44
4.5	Ensayo de biorremediación <i>in vitro</i> .....	46
4.6	Ensayo de biorremediación a mayor escala.....	49
V.	CONCLUSIONES.....	52
VI.	RECOMENDACIONES .....	54
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
	ANEXOS .....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los principales derivados de petróleo.....	24
Tabla 2. Localización y coordenadas UTM de los puntos de muestreo. ..	32
Tabla 3. Primers utilizados para la amplificación de fragmentos de genes oxigenasas en cepas bacterianas .....	37
Tabla 4. Cantidad de cepas bacterianas aisladas y purificadas .....	40
Tabla 5. Cepas bacterianas identificadas molecularmente .....	41
Tabla 6. Características morfológicas de las colonias bacterianas seleccionadas.....	42
Tabla 7. Caracterización de las cepas bacterianas a través de las pruebas Gram, catalasa y oxidasa.....	43
Tabla 8. Conteo de bacterias cultivadas en medio plate count agar y Bushnell Haas agar .....	47
Tabla 9. Análisis de hidrocarburos totales de petróleo en el agua de mar en el ensayo de mayor escala.....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía satelital de la ubicación del Laboratorio de Biología Molecular de la FIPCM. ....	29
Figura 2. Área de extracción y perforación de petróleo Lote Z-1, plataforma CX-11 de Tumbes. ....	30
Figura 3. Puntos de muestreo en playa y mar aledaños a las plataformas petroleras CX-11 y CX-15 .....	32
Figura 4. Esquema de la programación del termociclador para la amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr.....	35
Figura 5. Esquema de la programación del termociclador para la amplificación de fragmento de genes oxidasa en bacterias. ....	37
Figura 6. Gel de electroforesis de las cepas bacterianas para el gen benceno di-oxigenasa. a) Bandas fluorescentes indicadoras de un producto de amplificación de alrededor de 200 pb y b) Bandas fluorescentes indicadoras de un producto de amplificación de alrededor de 800 pb.....	45
Figura 7. Ensayo de biorremediación <i>in vitro</i> de las cepas bacterianas seleccionadas. A), B), C) y D) muestran las cepas con mejores resultados de degradación: cepas 87, 98 y 147 de <i>B. cereus</i> y cepa 124 de <i>B. subtilis</i> . E), F) y G) muestran las cepas con resultado más modesto.....	47
Figura 8. Crecimiento en placas de las cepas bacterianas seleccionadas en la biorremediación <i>in vitro</i> . A), B), C) y D) muestran los resultados del conteo de las UFC 87, 98 y 147 de <i>B. cereus</i> y cepa 124 de <i>B. subtilis</i> . E), F), G) y H) los correspondientes a las cepas 123, 176, mix y 98. ....	48

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Informe del análisis del contenido de hidrocarburos totales al inicio de la investigación.....	65
Anexo 2. Informe del análisis del contenido de hidrocarburos totales al final de la investigación.....	67
Anexo 3. Diseño de uno de los tanques y conexiones empleados en el ensayo de biorremediación a mayor escala.....	69
Anexo 4. Análisis de varianza para el porcentaje de reducción de HTP en el ensayo de biorremediación en mayor escala.....	70
Anexo 5. Prueba de Duncan para el porcentaje de reducción de HTP en el ensayo de biorremediación en mayor escala.....	70
Anexo 6. Prueba de Tukey para el porcentaje de reducción de HTP en el ensayo de biorremediación en mayor escala.....	70

## RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar bacterias marinas cultivables degradadoras de hidrocarburos de las áreas de extracción y perforación de petróleo de la plataforma CX-11 en Tumbes. Se recogieron muestras de agua de la línea costera y zona adyacente a la plataforma, éstas fueron sembradas en caldo Bushnell Haas con petróleo crudo mesa 30 (PCM30). Las cepas fueron purificadas en agar Bushnell Haas y en agar tripticasa soya, se identificaron molecularmente y se determinó si portaron genes oxigenasas: xileno mono-oxigenasa, tolueno di-oxigenasa, naftaleno di-oxigenasa, etilbenceno, naftaleno di-oxigenasa, bifenil di-oxigenasa, y benceno di-oxigenasa (indicadores de su poder biorremediador). Se seleccionaron 27 cepas para ensayo de biorremediación *in vitro*; las cepas con mejores resultados se emplearon en ensayo de biorremediación a mayor escala en tanques de 50 l con agua de mar con PCM30. Se aislaron de las muestras 107 cepas bacterianas que crecieron en medio con petróleo, 27 portaron genes de benceno-dioxigenasa, 23 fueron identificadas como pertenecientes a *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Pantoea*. De las 27 cepas del ensayo *in vitro*, las cepas 87, 98 y 147 de *Bacillus cereus* y la 124 de *Bacillus subtilis* mostraron el mayor poder degradador de petróleo, seguidas del consorcio de las mismas cepas con un poder intermedio y por último las cepas de *S. epidermidis* (123) y *Pantoea dispersa* (176) con el menor poder. En el ensayo de biorremediación a mayor escala, los tratamientos T2 (consorcio de cepas de *B. cereus* y *B. subtilis*: 87, 98, 124, y 147), T3 (consorcio de cepas de *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. epidermis* y *P. dispersa*: 87, 98, 124, 147, 123 y 176), T4 (cepa 87 de *B. cereus*) produjeron una biodegradación mayor al 99% del petróleo, mostrando su alto poder degradador. Pero en el tratamiento control se tuvo una biodegradación estadísticamente similar, probablemente por cepas autóctonas que fueron bioestimuladas y degradaron el petróleo.

**Palabras clave:** Biorremediación, petróleo, oxigenasas, contaminación en mar y playas, remediación *in situ*, cepas degradadoras de petróleo.

## ABSTRACT

The aim of this research was to isolate and characterize culturable hydrocarbon-degrading marine bacteria from the oil extraction and drilling areas of the CX-11 platform in Tumbes. Water samples were collected from the coastline and area adjacent to the platform; these were seeded in Bushnell Haas broth with table 30 crude oil (PCM30). The strains were purified on Bushnell Haas agar and trypticase soy agar, they were molecularly identified and it was determined if they carried oxygenase genes: xylene mono-oxygenase, toluene di-oxygenase, naphthalene di-oxygenase, ethylbenzene, naphthalene di-oxygenase, biphenyl di-oxygenase, and benzene di-oxygenase (indicators of their bioremediation power). 27 strains were selected for *in vitro* bioremediation testing; the strains with the best results were used in a larger scale bioremediation trial in 50 l tanks with seawater with PCM30. 107 bacterial strains that grew in oil medium were isolated from the samples, 27 carried benzene-dioxygenase genes, 23 were identified as belonging to *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Pantoea*. Of the 27 strains of the *in vitro* test, strains 87, 98 and 147 of *Bacillus cereus* and 124 of *Bacillus subtilis* showed the greatest oil-degrading power, followed by the consortium of the same strains with an intermediate power and finally the strains of *S. epidermidis* (123) and *Pantoea dispersa* (176) with the lowest power. In the larger scale bioremediation trial, treatments T2 (consortium of strains of *B. cereus* and *B. subtilis*: 87, 98, 124, and 147), T3 (consortium of strains of *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* and *P. dispersa*: 87, 98, 124, 147, 123 and 176), T4 (strain 87 of *B. cereus*) produced biodegradation greater than 99% of the oil, showing its high degrading power. But in the control treatment there was a statistically similar biodegradation, probably due to native strains that were biostimulated and degraded the oil.

**Keywords:** Bioremediation, oil, oxygenases, pollution in the sea and beaches, *in situ* remediation, oil degrading strains.

## I. INTRODUCCIÓN.

El petróleo es a nivel mundial uno de los contaminantes más problemáticos, su efecto negativo se observa en mayor medida cuando se producen derrames petroleros, por ejemplo, en el lapso de menos de 50 años partiendo de 1970, se han producido derrames en el medio marino por un volumen de  $5,7 \times 10^6$  t. El derrame producido en el año 2010 en el Golfo de México, en la plataforma Deepwater Horizon derramó  $3,19 \times 10^6$  barriles de petróleo (Cerqueda-García et al., 2020).

En el Perú de igual manera se tiene registro de derrames petroleros que se han producido en diferentes puntos de su territorio principalmente en la costa y selva se puede mencionar que en las playas de Conchán (Lima) en 1995 se produjo una mancha de petróleo por el vertimiento de petróleo equivalente a cientos de barriles. Posteriormente, en el departamento de La Libertad en el año 2000 se produjo un derrame de más de 100 barriles de petróleo; ese mismo año se vertieron más de 5000 barriles en el río Amazonas (Austermühle, 2010). En años posteriores, se produjeron derrames en Pariñas, Piura (2002), en el río Marañón (2007 y 2010) y en la región de Trompeteros, Loreto (2012) (Peralta et al., 2021).

Uno de los derrames de petróleo más recientes que ocurrieron en Perú, se produjo en La Pampilla el año 2022 cuando casi de 12 000 barriles fugaron al mar y se extendieron por 24 playas, ocupando  $1\,739\,000 \text{ m}^2$ , entre el mar y las playas. El petróleo también fue llevado por las corrientes y dañó más de 2000 ha en las Reservas de Puntas Guaneras y de Ancón (Pulido et al., 2022).

La región Tumbes no ha estado exenta de problemas por derrames petroleros, uno de éstos ocurrió en 2007 en el bloque Z-1 lote CX-11 de BPZ Exploration and Production, específicamente en la plataforma Corvina ubicada en el mar frente al distrito de La Cruz (Geolab SRL, 2011), de igual manera en 2014, se produjo un nuevo derrame que afectó las costas de Zorritos, nuevamente por un vertimiento proveniente de la plataforma Albacora (Defensoría del Pueblo, 2014). Los datos antes reportados indican que el riesgo de que se produzca un derrame de petróleo

que puede afectar a las aguas marinas y la zona costera de Tumbes, e inclusive al ecosistema del manglar es real, por ello se debe trabajar en encontrar métodos para reducir el impacto ambiental de tales derrames, así como para lograr la restauración de la zona contaminada en el menor tiempo.

Los derrames petroleros dañan a los organismos en los ecosistemas, pero dicho daño es mayor en ecosistemas costeros, pues el derrame se extiende por las corrientes marinas y las olas, además puede estar mucho más tiempo en este ecosistema por su viscosidad que lo hace adherirse a arena y rocas, por su poca densidad que lo hace mantenerse flotando sobre las aguas, por su baja tasa de degradación química que lo hace persistir y por su capacidad de bioacumularse en los organismos (Dai et al., 2020). Debido a ello, es que se requiere desarrollar tecnologías adecuadas para tratar tales derrames, siendo la biorremediación tal vez una de las que tienen un mayor potencial (Lee et al., 2018).

El petróleo es una sustancia difícil de metabolizar pues está compuesta de un gran número de sustancias desde muy simples a muy complejas, las simples son de bajo peso molecular bajo y presentan los enlaces de sus carbonos saturados o insaturados; las sustancias más complejas tales como el naftaleno y alquitrán contienen anillos cíclicos; muchas de las sustancias en el petróleo son tóxicas, cancerígenas o mutagénicas de allí el gran peligro que representa para los organismos (Ławniczak et al., 2020).

El tratamiento de la contaminación por hidrocarburos mediante la biorremediación bacteriana, trata de convertir las fracciones de mayor peso molecular (alquitrán, naftenos) en fracciones de menor peso molecular que son menos estables, en algunos casos es posible que ciertas fracciones del petróleo sean convertidas en dióxido de carbono y metano (Logeshwaran et al., 2018). Las bacterias con propiedades biorremediadoras poseen en su genoma genes que codifican para enzimas que utilizan el petróleo como fuente de energía (ya sea monoxigenasas como dioxigenasas), éstas favorecen que los alcanos cíclicos y lineales se conviertan en alcoholes (Pi et al., 2016).

Las bacterias con propiedades biorremediadoras se pueden hallar en diversos ambientes, así por ejemplo Cerqueda-García et al. (2020), descubrieron en el medio marino (sustrato y agua), comunidades de bacterias capaces de metabolizar buen número de fracciones de petróleo, desde las que tuvieron muy poco peso molecular hasta las de máximo peso. Por otra parte Dai et al. (2020), aplicaron un

conjunto de bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Brevibacillus* así como de sus enzimas inmovilizadas, en la arena de zonas de playa en las que se agregó petróleo, encontrando que éstas pudieron degradar hidrocarburos poliaromáticos (HAP) y largas cadenas de n-alcanos (de 26 a 35 C). Lee et al. (2018), pudieron degradar petróleo utilizando cepas que producen surfactantes correspondientes a las especies *Rhodococcus soli*, *Pseudoalteromonas agarivorans*, *Isoptericola chiayiensis* y *Bacillus algicola*.

Liu et al. (2021), han señalado que bacterias del género *Vibrio* son capaces de biorremediar petróleo afirmando que son las principales degradadoras de HAP; las cepas que han mostrado poder para biorremediar petróleo pertenecen a las especies de *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio* spp. (Bravo, 2018; Çardak et al., 2007; Fernandes et al., 2020).

En el caso de la región Tumbes, también se han encontrado bacterias con capacidad para biorremediar hidrocarburos, las mismas que poseen genes oxigenasas, así por ejemplo Ramírez et al. (2016), pudieron aislar del sustrato del manglar, cinco cepas bacterianas que pudieron metabolizar del 77 al 82% de los hidrocarburos totales del petróleo presentes en un suelo del manglar contaminado de manera experimental con petróleo, esto muestra que es posible obtener cepas biodegradadoras a partir de muestras de suelo procedentes de ecosistemas marino costeros que hayan tenido algún tipo de contaminación por petróleo, como pueden ser también las muestras de las zonas aledañas a la plataforma CX-11 de BPZ en Tumbes.

Por ello en esta investigación se tuvo como objetivo:

Aislar y caracterizar bacterias marinas cultivables degradadoras de hidrocarburos de las áreas de extracción y perforación de petróleo Lote Z-1, plataforma CX-11, Tumbes.

## **II. REVISIÓN DE LA LITERATURA**

### **2.1 Bases teóricas.**

#### **2.1.1 Bacterias**

Los microorganismos conocidos como bacterias son seres procariotas de reducido tamaño, en la escala de micrómetros, y se distribuyen ampliamente en todo el mundo. Exhiben la capacidad de emplear diversas sustancias como fuente de energía, inclusive tolerando y utilizando ciertos contaminantes con este propósito. Esto abre la posibilidad de utilizar determinadas bacterias para abordar la remediación en áreas afectadas por actividades humanas o fenómenos naturales (Gómez et al., 2006).

#### **2.1.2 Características de las bacterias**

De manera general, las bacterias presentan atributos que posibilitan su identificación, tales como tamaño, forma y color de las colonias, que sirven como criterios taxonómicos para su clasificación. Asimismo, se emplean propiedades bioquímicas y la observación de la forma celular y la coloración tras la aplicación de la tinción de Gram como métodos fundamentales de identificación. A nivel macroscópico, las colonias pueden adoptar formas circulares, rizoides o irregulares, y exhibir elevaciones convexas, aplanadas o umbilicadas (Rahman et al., 2007).

#### **2.1.3 Características microscópicas y macroscópicas**

La técnica de tinción constituye el primer paso en el proceso de identificación bacteriana, siendo la tinción de Gram una de las más reconocidas, permitiendo distinguir entre bacterias Gram negativas y Gram positivas de manera rápida y sencilla. Otra técnica comúnmente utilizada es la del azul de metileno (Fernández et al., 2010). La evaluación de colonias en cultivos frescos resulta crucial para garantizar la pureza del cultivo, asegurando que esté compuesto por un único tipo de bacterias y que provenga de una sola célula. En muchos casos, el tamaño de las colonias es uniforme dentro de una misma especie, y ciertas bacterias, como

*Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens*, muestran características pigmentarias específicas facilitando su identificación (Fernández et al., 2010).

#### 2.1.4 Método molecular de identificación bacteriana

Un desafío en la identificación bacteriana radica en la elección del protocolo, ya que las observaciones fenotípicas no confirman las especies. En este contexto, las técnicas moleculares se presentan como herramientas de diagnóstico confirmatorio, destacando el análisis de la secuencia genética del gen 16S ARNr. Este enfoque proporciona información rápida y útil para la identificación y filogenia bacteriana mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen una amplia variedad de secuencias bacterianas (Fernández et al., 2010).

#### 2.1.5 Sustancias que integran las fracciones del petróleo

El petróleo es una mezcla de sustancias, principalmente de hidrocarburos, como naftenos, parafinas, isoparafinas e hidrocarburos aromáticos, y se presenta como un líquido viscoso de color negro. Desde el punto de vista químico, el petróleo está conformado por carbono (84 a 87%), hidrógeno (11 a 14%), azufre (0 a 8%), oxígeno y nitrógeno (0 a 4%). Sus componentes principales se dividen en fracciones, como se detalla en la tabla 1 (Viñas, 2005).

Tabla 1. Composición de los principales derivados de petróleo.

Fracciones	Composición
Saturados	n-alcanos, alcanos de cadena ramificada e isoprenoides y ciclo parafinas o cicloalcanos, hópanos. Aromáticos Hidrocarburos mono aromáticos, di aromáticos
Aromáticos	Hidrocarburos mono aromáticos, di aromáticos, aromáticos policíclicos (HAP)
Resinas	Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas
Asfáltenos	Ácidos grasos, metal o porfirinas, fenoles polihidratados

### **2.1.6 Hidrocarburos totales del petróleo (HTP)**

El petróleo crudo, también denominado petróleo sin refinar, se categoriza según su estructura en hidrocarburos aromáticos, conocidos como no saturados, los cuales son carcinógenos y bioquímicamente activos, y en alifáticos, que se subdividen en alquenos, alcanos, alquinos y ciclo alifáticos. Los alcanos, debido a su baja polaridad, son insolubles en agua y no pueden formar enlaces con el hidrógeno (Ángeles, 2015).

### **2.1.7 Impacto de los hidrocarburos de petróleo en el medio marino**

Según Viñas (2005), los diversos compuestos del diesel y sus derivados presentan niveles variables de toxicidad en el medio marino. Las parafinas, en particular, tienen un grado moderado de toxicidad, causando anestesia y narcosis en organismos vivos, mientras que concentraciones elevadas pueden ocasionar daño celular y muerte. Por otro lado, los naftenos generan alteraciones en el comportamiento relacionado con la búsqueda de alimento, el escape de depredadores y la atracción sexual. En las zonas costeras afectadas por el transporte de petróleo, se pueden observar impactos en las tasas de fotosíntesis y respiración. A concentraciones bajas, el petróleo puede afectar la división celular y el crecimiento planctónico, resultando en la muerte de larvas de peces en gran cantidad.

### **2.1.8 Biorremediación**

De acuerdo con Rahman et al. (2007), la mayoría de los procesos biológicos utilizados para mitigar el impacto negativo de contaminantes en el medio ambiente se centran en la eliminación de los contaminantes en suelos, agua y aire. Algunos microorganismos, como ciertas bacterias, tienen la capacidad de convertir moléculas de contaminantes orgánicos en dióxido de carbono, agua e iones inorgánicos esenciales para los ciclos biogeoquímicos. También pueden oxidar o reducir agentes inorgánicos contaminantes, facilitando la regeneración de ecosistemas afectados por sustancias orgánicas como el petróleo y sus hidrocarburos, así como por plaguicidas, sustancias inorgánicas y algunos contaminantes metálicos.

### 2.1.9 Degradación de hidrocarburos

La degradación de hidrocarburos implica la transformación de contaminantes a través de procesos biológicos. Estos procesos de remediación pueden llevarse a cabo *in situ* o mediante la separación de la porción contaminada *ex situ* (Ángeles, 2015).

## 2.2 Antecedentes

Varias investigaciones han mostrado la eficacia de cepas bacterianas aisladas de entornos naturales o de zonas contaminadas con petróleo, como biodegradadoras de petróleo, se puede mencionar:

Plata (2023), evaluó la eficacia de 12 cepas bacterianas biodegradadoras de petróleo pertenecientes a las especies *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Erwinia* sp., *Idiomarina* sp., *Microbacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Shewanella* sp., *Thalassospira* sp. y *Vibrio* sp., que fueron aisladas de una zona en el Golfo de México; esas cepas se probaron individualmente y como consorcio (seleccionados con diseño *simplex-lattice* usando Design Expert 7), dichos consorcios estuvieron constituidos por las 12 cepas, con una cepa mayoritaria, equivalente al 50% de la comunidad bacteriana, mientras el 50% restante estuvo constituido de manera equitativa por las 11 cepas restantes. Los consorcios se cultivaron en matraces con agar mínimo marino suplementado con 100 ppm de petróleo crudo libre de asfaltenos como fuente de carbono, los ensayos se evaluaron a los 12 y 30 días, encontrando que las cepas mostraron capacidad biosurfactante, lo que ayuda a solubilizar los hidrocarburos y hacerlos más disponibles; adicionalmente, se observó que si bien cada una de las cepas ensayadas lograron biodegradar petróleo, los consorcios mostraron un mayor poder degradador. Los consorcios con mayor poder degradador fueron aquellos cuyas cepas mayoritarias fueron *Shewanella* sp. con 63,5% de reducción de hidrocarburos, *Vibrio* sp. con 55,6% y *Pseudoalteromonas* sp. con 51%.

Palacios & Zambrano (2023), ensayaron, en Manabí (Ecuador), cinco cepas de *Bacillus* sp. aisladas de la Antártida, en la biodegradación de petróleo a nivel de Laboratorio, para ello masificaron las cepas bacterianas, las aclimataron en un medio mineral con única fuente de carbono el diesel, realizaron un experimento en

los que ensayaron como tratamientos las cinco cepas cuya actividad se evaluó en tres momentos (24, 48 y 72 h). Los resultados mostraron que la cepa GA-52 de *Bacillus* sp. fue la que mayor degradación produjo en el diesel, siendo capaz de degradar al 52% del combustible.

Perdigão et al. (2020), utilizaron un consorcio de cinco bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus*, capaces de degradar hidrocarburos aisladas de la playa de Cabo del Mundo (Portugal) en una zona cercana a una refinería de petróleo. Las cepas se hicieron crecer en medio sólido, luego se tomaron colonias bacterianas y se colocaron en caldo Bushnell-Haas con 2% de NaCl, estandarizándose su densidad óptica (OD600) a 0,1. Este consorcio se ensayó respecto a su desempeño en la degradación de hidrocarburos en experimentos de biorremediación en microcosmos con agua de mar y petróleo, para evaluar: atenuación natural (NA), bioestimulación (BS) con adición de nutrientes, bioaumentación con inóculo pre-crecido en petróleo (BA/P) y bioaumentación con inóculo pre-crecido en acetato (BA/A). Después de 15 días, se observó un aclaramiento del petróleo en agua de mar en BS, BA/P y BA/A, pero no en NA. El acetato fue el mejor sustrato para el crecimiento del consorcio. BA/A mostró la mayor tasa de degradación de hidrocarburos (66%). Todas las cepas bacterianas añadidas como inóculo fueron recuperadas al final del experimento demostrando que pudieron proliferar en el medio y biodegradar al petróleo.

Hamdan et al. (2019), aislaron 32 cepas bacterianas (mediante aislamiento directo y por enriquecimiento) de efluentes de una refinería petrolera. 14 de las cepas emplearon el petróleo como fuente de carbono y de éstas, 4 cepas fueron capaces en 36 h de pasar a incoloro los medios a los que se agregó 2,6-diclorofenolindofenol (este indicador es de color azul en medio reducido e incoloro en medio oxidado), estas cepas fueron *Acinetobacter baumannii* OCB1, *Bacillus cereus* WD22 y *Pseudomonas aeruginosa* WD23 y WDE11, estas cepas tuvieron alta resistencia a la salinidad (hasta 40 ‰); las cepas fueron probadas al ser expuestas a un medio con petróleo (1% v/v) al que se agregó pequeñas cantidades de glucosa y extracto de levadura. La cepa WD23 logró el mejor resultado degradando el 27,25% del petróleo en 15 días.

Sakthipriya et al. (2015), emplearon cepas de *Bacillus subtilis* aisladas del vertedero de polímeros de Chennai (India), estas fueron masificadas en un reactor usando como medio de cultivo 200 ml de agua destilada con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,3 g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,6 g),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,2 g),  $\text{NaCl}$  (0,5 g), glucosa (0,8 g) y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g), al medio se añadió petróleo crudo ceroso (2% v/v). La cepa bacteriana creció bastante bien hasta el día 12 de cultivo, su población se mantuvo estable hasta el día 15 y luego decreció, la mayor población lograda fue de  $28 \times 10^6$  UFC/ml; se observó también una disminución del 80% en la degradación del petróleo crudo y una reducción del 60% en la viscosidad en un período de 10 días. Adicionalmente las cepas mostraron características de un biorremediador (alta adherencia, reducción de la tensión superficial, capacidad para emulsificar, producción de gran cantidad de biosurfactante, reducción de la viscosidad y alta tasa de degradación).

A nivel nacional, se puede mencionar la investigación realizada en Talara (Perú) por Avila (2016), quien aisló cuatro cepas de *Pseudomonas* con poder biodegradador de botaderos de residuos de petróleo, estas cepas fueron desafiadas cultivándolas por 20 días en medio mineral modificado con 0,05% de extracto de levadura y 0,2% de petróleo crudo, se evaluó al inicio y al final del experimento el contenido de hidrocarburos totales de petróleo mediante el método gravimétrico para grasas y aceites. Se pudo observar que la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas* sp<sub>4</sub>) fue la que logró mayor eficiencia biodegradadora, habiendo reducido el contenido de petróleo al 60,5%.

Por otra parte, a nivel local, también se tiene una investigación realizada por Ramírez et al. (2016), quienes aislaron cepas bacterianas presentes en suelo contaminado por combustibles en el manglar de Tumbes, estas cepas correspondieron a *Exiguobacterium profundum*, *Bacillus aryabhatai*, *Arthrobacter mysorens*, *Vibrio fluvialis* y *Acinetobacter venetianus* que mostraron poder biodegradador de hidrocarburos totales de petróleo (HTP), además hicieron un experimento en el que trataron muestras de suelo manglar con 9,6% de HTP logrando una reducción de estadísticamente superior del nivel de HTP en los tratamientos con las cepas biorremediadoras frente al tratamiento testigo (niveles de HTP de 77 a 82% en tratamientos experimentales y de 68 % en el testigo).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar y periodo de ejecución de la investigación

El estudio se llevó a cabo de febrero a agosto de 2019 en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar (FIPCM) de la Universidad Nacional de Tumbes, ubicada en la Villa de Puerto Pizarro en el distrito, provincia y región Tumbes, misma que tiene como coordenadas geográficas en UTM E-567387,98 y N-9612554,01, como se aprecia en la imagen satelital de Google Earth (figura 1)



Figura 1. Fotografía satelital de la ubicación del Laboratorio de Biología Molecular de la FIPCM.

#### 3.2 Tipo y diseño de investigación

La investigación fue de tipo aplicada y cuantitativa; aplicada, por cuanto se buscó conocer, actuar y modificar una realidad problemática, a través de encontrar una posible alternativa de solución ante el evento de un derrame petrolero en las costas de Tumbes, además fue cuantitativa pues se basó en medir o cuantificar las variables en investigación.

El diseño de investigación fue experimental y transversal puesto que se manipuló la variable independiente, al aplicar cepas bacterianas degradadoras de petróleo a

fin de observar su efecto en la variable dependiente es decir en la concentración de hidrocarburos.

Por otra parte, la investigación fue transversal pues la evaluación de las variables se realizó en un solo momento de tiempo.

### 3.3 Población y muestra de estudio

**Población.** Estuvo conformada por las bacterias marinas cultivables degradadoras de hidrocarburos que pueblan el agua adyacente al área de extracción y perforación de petróleo Lote Z-1, plataforma CX-11 de Tumbes. La cual se encuentra ubicada en las siguientes coordenadas geográficas en UTM: E 528504 y N 9603003, como se observa en el mapa tomado de (Guevara et al., 2010) (figura 2).



Figura 2. Área de extracción y perforación de petróleo Lote Z-1, plataforma CX-11 de Tumbes.

**Muestra.** Estuvo constituida por las bacterias que se recogieron en 8 litros de agua de mar extraída del área adyacente a la plataforma CX-11.

**Muestreo.** Se realizó cada quince días y por un lapso de cuatro meses la recolección de muestras de agua de la zona adyacente a la plataforma CX-11.

### **3.4 Recolección de las muestras.**

Se realizaron siete muestreos; cuatro de ellos se hicieron en la línea de playa frente a las plataformas CX-11 y CX-15, y los tres restantes en el agua que circunda dichas plataformas. Las muestras tomadas en la línea de playa se colectaron en el momento cuando la marea se encontraba baja, las muestras se tomaron seleccionando de forma aleatoria el punto de muestreo en una distancia de 2500 m lineales en la playa Caleta Grau. Las muestras de agua de mar se colectaron de puntos seleccionados al azar en la zona de extracción (plataforma y buque almacén), la colecta se realizó desde un bote a motor a una distancia de 17 km de la costa de Caleta La Cruz (Figura 3 y tabla 2).

En cada lugar de muestreo, tanto en línea de playa como en el mar, se realizaron dos submuestreos, colectando agua con botellas esterilizadas de vidrio de borosilicato redondo graduado de 250 ml con tapa rosca azul con cubierta de plástico; la primera submuestra se tomó del agua superficial y la segunda 30 cm por debajo de la superficie del agua. Se tomaron la temperatura, concentración de oxígeno disuelto, pH y salinidad del agua, usando respectivamente un oxímetro marca YSI Modelo DO200A, un pH metro marca Hanna modelo HI-98103 y un refractómetro marca ATC. También se registraron las coordenadas de los lugares donde se realizaron los muestreos con un equipo de geoposicionamiento global o GPS de la marca Garmin modelo Etrex-10.

Las muestras de agua fueron transportadas hasta el laboratorio de Biología Molecular en una caja de tecnopor con hielo que permitió mantener la temperatura de las mismas en alrededor de 7 °C.

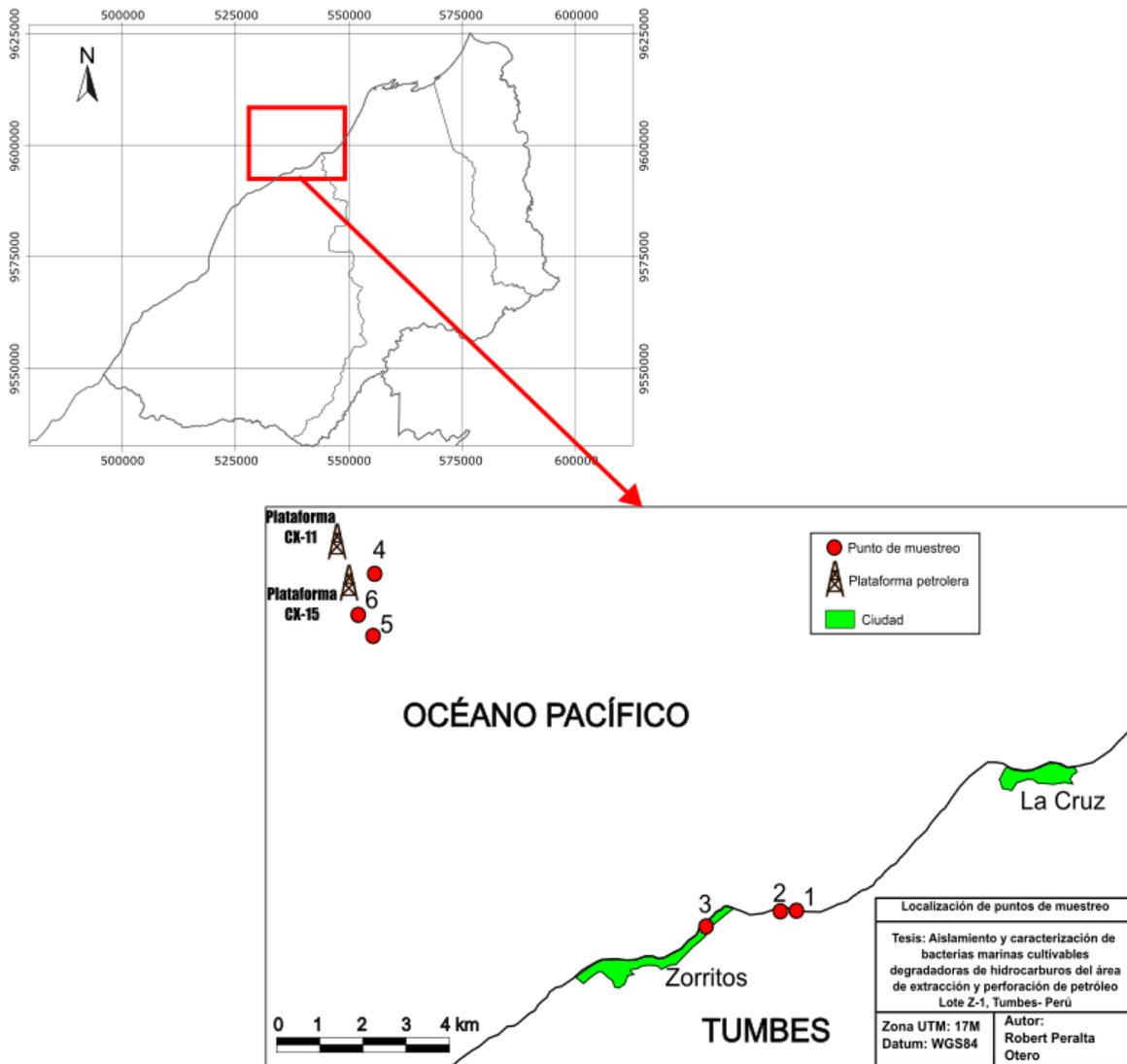


Figura 3. Puntos de muestreo en playa y mar aledaños a las plataformas petroleras CX-11 y CX-15

Tabla 2. Localización y coordenadas UTM de los puntos de muestreo.

Punto de muestreo	Localización	Coordenadas en UTM (Datum WGS84, Zona 17M)	
		Longitud	Latitud
1	Línea de playa frente antiguo Pozo Petrolero	E-539530	N-9594780
2	Línea de playa frente a la Gruta La Chilenita	E-539339	N-9594723
3	Línea de playa frente al Estadio de Zorritos	E-537564	N-9594259
4	Frente a la plataforma CX-11	E-529169	N-9601892
5	Frente a la barcaza de almacenamiento	E-529169	N-9601189
6	Frente a la plataforma CX-15	E-528983	N-9601327

### 3.5 Siembra de las muestras

Las muestras de agua fueron enriquecidas durante tres días sembrándolas en matraces de 120 ml conteniendo 60 ml de caldo Bushnell Haas (BHA) (Himedia), al cual se añadió como única fuente de carbono, 500 µl de petróleo crudo mesa 30

(PCM30). Se proporcionó agitación a los matraces a 200 rpm mediante un *shaker* de alta capacidad marca Labnet modelo Orbit 1900. Luego del enriquecimiento, las bacterias con capacidad biorremediadoras fueron aisladas sembrando por barrido 20 µl de las muestras enriquecidas en BHA y agar tripticasa soya (TSA), para ello se prepararon placas petri con dichos medios, a los cuales se adicionó 60 µl de PCM30 y 3% de NaCl, las placas se colocaron en una incubadora marca Memmert modelo SN76, a 35 °C por 24 a 48 h.

### **3.6 Caracterización fenotípica de las colonias bacterianas**

Las colonias de bacterias que crecieron en el medio BHA y TSA, fueron caracterizadas fenotípicamente al observarse a través de un estereoscopio su tamaño, forma y color.

### **3.7 Purificación de las colonias aisladas**

La purificación de las cepas se logró al sembrar por agotamiento de manera sucesiva en placas petri con medio BHA y con TSA suplementado con NaCl (3%), la siembra sucesiva se detuvo cuando se observó que todas las colonias bacterianas que crecían en una misma placa petri mostraron características morfológicas similares (tamaño, forma y color similares).

Se confirmó que las colonias fueron puras luego de que se les aplicaran las pruebas de tinción de Gram así como las de oxidasa y catalasa.

### **3.8 Tinción de Gram**

Se aisló una colonia, de la cepa que aparentemente fue pura, la misma que se colocó utilizando un asa bacteriológica en una laminilla portaobjeto, se pasó la laminilla por encima del fuego, para lograr la fijación de la colonia bacteriana, luego se le aplicó por 1 min cristal violeta, se enjuagó con agua destilada; a continuación se añadió lugol, dejándosele actuar por 1 min, se enjuagó con agua destilada, luego se le añadió alcohol acetona, se dejó actuar por 30 segundos, se enjuagó con agua destilada. Por último se le añadió safranina, se dejó actuar por 1 min y se enjuagó con agua destilada. El portaobjeto se dejó secar por algunos minutos, luego se colocó al microscopio y se observó a una resolución de 1000X, identificándose la forma de las bacterias y la coloración de las mismas, púrpuras en el caso de las gram positivas y fucsia en el caso de las gram negativas.

### **3.9 Pruebas de catalasa y oxidasa**

#### **3.9.1 Prueba de catalasa**

Se aisló una colonia de cada una de las cepas puras y se les colocó sobre portaobjetos. A cada una de ellas se les añadió una gota de agua oxigenada ( $H_2O_2$  al 3%), se esperó para observar si se producía alguna reacción, en el caso de que se formaran burbujas en el agua oxigenada se determinó que la cepa fue catalasa positiva, caso contrario, si no se formaron burbujas se trató de una cepa catalasa negativa.

#### **3.9.2 Prueba de oxidasa**

En el caso de la prueba de oxidasa, se tomó una colonia de la cepa pura, se le colocó sobre un portaobjeto y se le añadió una gota de una solución al 0,85% de NaCl, agitándose para suspender la colonia en la gota. Se tomó una tira de oxidasa marca Oxoid y se puso en contacto con la gota en la que se suspendió la colonia bacteriana, se observó por un minuto para determinar si se producía un cambio de color de la tira, en el caso que la tira viró de incolora a azul violeta, se determinó que se trataba de una cepa oxidasa positiva, caso contrario, si la tira permaneció incolora, la cepa fue oxidasa negativa.

#### **3.10 Extracción de ADN**

La cepa pura fue cultivada en TSB, luego se tomó 950  $\mu$ l del cultivo, se colocó en un microtubo y se centrifugó a 16 000 xg por 5 min a una temperatura de 4 °C en una centrifuga marca Orto Alresa modelo Diricen 21R, el sobrenadante fue eliminado y se añadió al microtubo 500  $\mu$ l de *buffer* fosfato salino (PBS) (marca Sigma Aldrich a una concentración 1X), se centrifugó a 12 000 xg por 2 min a temperatura de 4 °C; nuevamente se descartó el sobrenadante adicionándose 200  $\mu$ l de tris-EDTA (TE) a una concentración de 1X, equivalente a una concentración de tris 10 mM y de EDTA 1mM, el TE fue ajustado a pH 8. El microtubo fue calentado a punto de ebullición (100 °C) durante 10 min, luego se colocó de inmediato por 5 minutos en hielo, esto para producir la lisis de las paredes bacterianas por el *shock* térmico. El microtubo se centrifugó a 16 000 xg durante 1 min, el sobrenadante, conteniendo el ADN, fue recuperado en otro microtubo. Luego se diluyó el contenido del microtubo con agua ultrapura en proporción 1:10.

Finalmente se agregó ARNasa (2  $\mu$ l) y se calentó a 37  $^{\circ}$ C por 30, esto a fin de digerir cualquier remanente de ARN y obtener ADN puro.

### 3.11 Identificación molecular de las cepas aisladas

Se preparó *mix* de buffer de PCR para la amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr bacteriano, para lo cual se calculó la cantidad necesaria de cada reactivo, según el número de reacciones que se quiso realizar, así por ejemplo, para una reacción se mezcló 2,5  $\mu$ l de *buffer* de PCR 10X, constituido por MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, tris-HCl 10 mM y KCl 50 mM, pH 8,3), al cual se añadió 1,5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,5  $\mu$ l de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM; 17,4  $\mu$ l de agua ultrapura, así como 0,5  $\mu$ l de cada *primer* específico para la amplificación del gen 16S ARNr, 27F *forward* y 1492R *reverse*, y 0,1  $\mu$ l de Taq ADN polimerasa platinum marca Invitrogen. El *mix* preparado se distribuyó entre los tubos de PCR (tubos de capacidad máxima 200  $\mu$ l), añadiendo 23  $\mu$ l del *mix* preparado y 2  $\mu$ l del ADN extraído de la cepa pura.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó para un volumen de 25  $\mu$ l en un termociclador marca Applied Biosystems modelo SimpliAmp, cuya programación se muestra en la figura 4

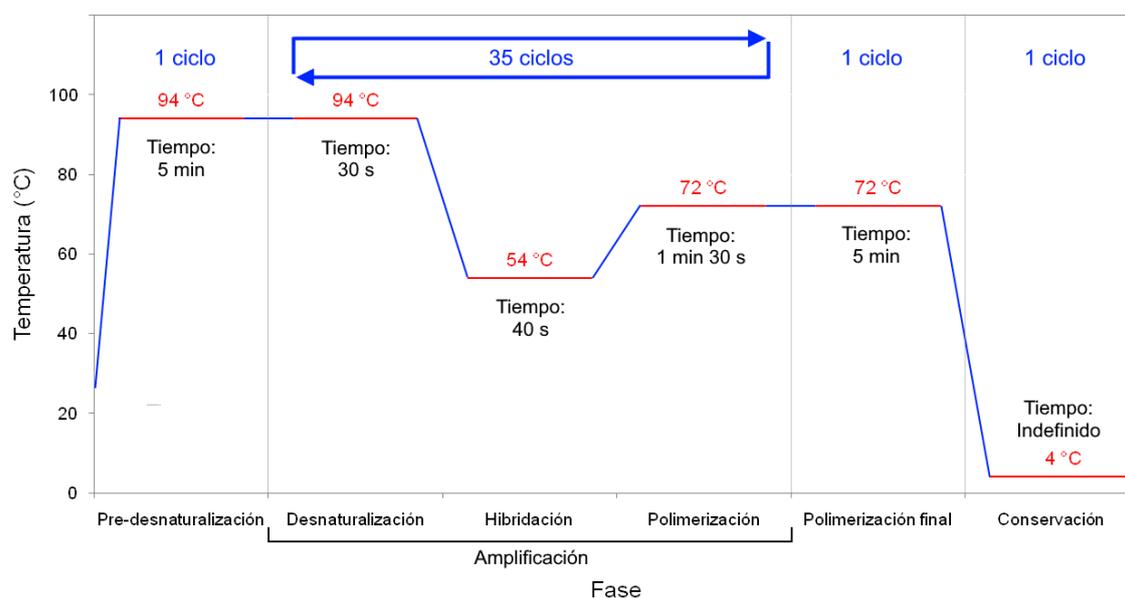


Figura 4. Esquema de la programación del termociclador para la amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr

Los productos de la PCR (amplicones) se enviaron a secuenciar al extranjero mediante el servicio provisto por BTS Consultores SAC, las secuencias de ADN obtenidas, se recortaron, alinearon y produjeron secuencias consenso con las cuales se realizó una búsqueda en la base de datos de GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) implementado en la web de NCBI en la dirección: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

### **3.12 Detección de genes codificadores de oxigenasas**

Para la detección de genes codificadores de oxigenasas, se preparó *mix* de reacción para la PCR para lo cual se calculó la cantidad necesaria de cada reactivo, según el número de reacciones que se quiso realizar, así por ejemplo, para una reacción se mezcló 2,5 µl de *buffer* DreamTaq 10X (marca Thermo Scientific)(incluye MgCl<sub>2</sub> 20 mM), 2,5 µl de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 2 mM; 16,75 µl de agua ultrapura, así como 0,5 µl de cada *primer* específico para la amplificación del gen dioxigenasa buscado, según se aprecia en la tabla 3, y 0,25 µl de polimerasa DreamTaq 5U/µl marca Thermo Scientific. El *mix* preparado se distribuyó entre los tubos de PCR (tubos de capacidad máxima 200 µl), añadiendo 23 µl del *mix* preparado y 2 µl del ADN extraído de la cepa bacteriana.

Tabla 3. *Primers* utilizados para la amplificación de fragmentos de genes oxigenasas en cepas bacterianas

Gen	Identificador	Secuencia de ADN	Temperatura de hibridación (°C)
Xileno mono-oxigenasa	TOL-F	(5'-TGA GGC TGA AAC TTT ACG TAG A-3')	58
	TOL-R	(5'-CTC ACC TGG AGT TGC GTA C-3')	
Tolueno di-oxigenasa	TOD-F	(5'-ACC GAT GAR GAY CTG TAC C-3')	58
	TOD-R	(5'-CTT CGG TCM AGT AGC TGG TG-3')	
Tolueno di-oxigenasa	TOL1-F	(5'-CGA GAA SAA CGA YTA YTA CA3')	55
	TOL1-R	(5'-TGG CRG CKT AAT TCC AGT-3')	
Naftaleno di-oxigenasa	NAF-F	(5'-ATG GCT TCA TCT AYG GTT GC-3')	55
	NAF-R	(5'-TGT TCA GCC TTT CCT GCT T-3')	
Benceno di-oxigenasa	BEN-F	(5'-AGC GTC TGG GTA GTA TAG AG-3')	55
	BEN-R	(5'-AGA AGG TAC GTA GTG TCT GA-3')	
Benceno di-oxigenasa	BEN A-F	(5'-CCC GAA TGT CGG CGA CTA-3')	58
	BEN A-R	(5'-TGT TGC GGG AGA TCA CGA T-3')	
Etilbenceno di-oxigenasa	eteb AC-F	(5'-ACG CAC AGC TAC TCG TTG CTT-3')	55
	eteb AC-R	(5'-CCG TGC ACT TCA CAT TCG AT-3')	
Naftaleno di-oxigenasa	NAH-F	(5'-CAA AAR CAC CTG ATT YAT GG-3')	52
	NAH-R	(5'-AYR CGR GSG ACT TCT TTC AA-3')	
Bifenil di-oxigenasa	BPH1-F	(5'-GGA CGT GAT GCT CGA YCG C-3')	55
	BPH1-R	(5'-TGT TSG GYA CGT TMA GGC CCA T-3')	

La PCR para detectar los genes oxigenasas se realizó en un volumen de 25 µl en un termociclador marca Applied Biosystems modelo SimpliAmp, cuya programación se muestra en la figura 5

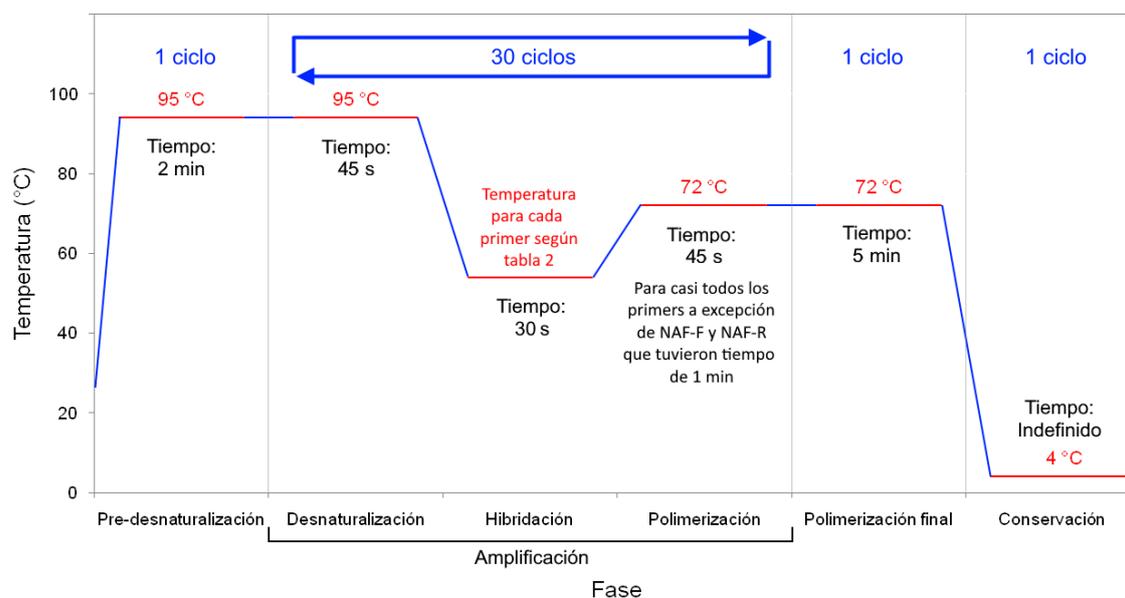


Figura 5. Esquema de la programación del termociclador para la amplificación de fragmento de genes oxidasa en bacterias.

### **3.13 Visualización de los amplicones**

Los amplicones fueron migrados en gel de agarosa al 1,5% al cual se aplicó como tinción bromuro de etidio hasta lograr una concentración de 50 µl/l. Se tomó 2 µl de cada amplicón y se mezcló con *buffer* de carga marca Thermo Fisher Scientific (constituido por EDTA 60 mM, glicerol 60%, cianol xileno FF 0,03 %, azul de bromofenol 0,03% y tris-HCl 10 mM), la mezcla se migró sobre el gel en un equipo de electroforesis horizontal marca Thermo Midicell-Primo modelo EC330a 90 V por 30 min. A continuación, el gel se llevó a un transiluminador para electroforesis en gel marca Blook, para la visualización de los amplicones.

### **3.14 Ensayos de biorremediación.**

#### **3.14.1 Biorremediación *in vitro***

Se seleccionaron seis cepas bacterianas representativas identificadas molecularmente por secuenciamiento de un fragmento de su gen 16S ARNr, las cuales se reactivaron para su recuento en placas petri con medio de cultivo plate count agar (PCA) y Bushnell Haas agar (BHA). Luego de que las cepas crecieron en los medios por 24 h, se realizó el conteo de sus colonias.

El ensayo *in vitro* se realizó en matraces de 125 ml de capacidad se adiciono 10 UFC, con 50 ml de caldo Bushnell Haas, suplementado con 2% de NaCl y 0,2% de petróleo Mesa 30 como única fuente de carbono, a temperatura ambiente(30°C) por 7 días con agitación constante a 200 rpm en un shaker. el crecimiento fue monitoreado diariamente por observación directa del cambio de separación de fases y coloración del medio de cultivo. al finalizar el experimento se determinó la viabilidad de crecimiento bacteriano en placas. Plate Count Agar y Bushnell Hass Agar. adicional se realizaron en paralelo dos tratamientos con 20 y 40 UFC.

Se tuvo 8 tratamientos; en 6 de ellos se aplicó las cepas seleccionadas por separado, en otro tratamiento se aplicó el consorcio de las seis cepas. En el tratamiento control no se aplicó cepas bacterianas.

En cada matraz con medio de cultivo se sembró 10 colonias de las cepas bacterianas que le correspondieron de acuerdo a su tratamiento.

Los tratamientos tuvieron dos repeticiones, siendo las unidades experimentales los matraces de cultivo, éstos se mantuvieron con agitación constante (200 rpm) provistos por un *shaker* marca Labnet modelo Orbit 1900 y a temperatura ambiente a alrededor de 30 °C por 7 días. La biodegradación de HTP fue evaluada a diario

observando las variaciones en las fases líquidas (agua y petróleo) así como los cambios de coloración del medio de cultivo. Al finalizar el experimento se determinó la viabilidad de crecimiento bacteriano presentes en los matraces, a través de observar su crecimiento en placas petri con medio plate count agar y Bushnell Haas agar.

### **3.14.2. Biorremediación a mayor escala con bacterias del agua de mar**

Se utilizaron 12 tanques plásticos cilíndricos de 50 l que fueron instalados en un área despejada de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, éstos fueron llenados con agua de mar trasladada en un camión cisterna y se les proporcionó aireación permanente mediante tuberías de PVC. A cada tanque se le aplicó 250 ml de crudo mesa 30.

Cada 3 días y por un lapso de 30 días, se agregó a cada tanque 25 ml del cultivo bacteriano que le correspondió de acuerdo al tratamiento asignado; en el caso del tratamiento control no se aplicó cultivo bacteriano, pero si un volumen igual de medio de cultivo estéril.

Al inicio del ensayo y al final del mismo, se tomó 1,2 litros de agua de cada uno de los tanques y se colocó en botellas de vidrio, dichas botellas fueron enviadas al Laboratorio de Investigación y Certificaciones de la Universidad Nacional de Ingeniería (Labicer-FC-UNI) ubicado en la ciudad de Lima para analizar su contenido de hidrocarburos totales de petróleo (TPH).

### **3.15. Procesamiento y análisis de datos**

El ensayo de biorremediación se realizó en dos etapas, la primera; ensayo de biorremediación *in vitro* y la segunda el ensayo de biorremediación a mayor escala ambas como un experimento bajo el diseño completamente al azar (DCA).

La evaluación estadística se realizó con análisis de varianza, prueba de Duncan y Tukey con  $\alpha = 5\%$ .

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Aislamiento y purificación de cepas bacterianas

De las muestras de agua colectadas, se logró aislar y purificar 107 cepas bacterianas; como se puede observar en la tabla 4, de los puntos de muestreo 1, 2 y 3 (correspondientes a la línea de playa) se pudo aislar la mayor cantidad de cepas (18 cepas), las cuales fueron aisladas en medio BHA suplementado con crudo mesa 30 (3 cepas) y en TSA (15 cepas). En comparación, de los puntos de muestreo 4, 5 y 6 (ubicados frente a la plataforma de perforación y explotación petrolera CX-11), se lograron aislar sólo 5 cepas, 4 de las cuales crecieron en medio BHA y la restante en medio TSA.

Tabla 4. Cantidad de cepas bacterianas aisladas y purificadas

Punto de muestreo	Localización	Coordenadas en UTM	Parámetros del agua				Cepas		Medio de cultivo
			Temp (°C)	Oxíg (mg/l)	Salin (‰)	pH	Cantidad	Denominación	
1	Línea de playa frente antiguo Pozo Petrolero	E-539530 N-9594780	30	5,09	37	7,3	7	37,38,39,41,43,45 y 46	TSA
2	Línea de playa frente a la Gruta La Chilenita	E-539339 N-9594723	30	5,09	37	7,12	6	87,98,108,123,124 y 174	TSA
3	Línea de playa frente al Estadio de Zorritos	E-537564 N-9594259	30	5,09	37	7,6	5	176, 178,187,200 y 210	TSA
4	Frente a la plataforma CX-11	E-529169 N-9601892	26	7,43	38	7,11	2	36 y 78	BHA
5	Frente a la barcaa de almacenamiento	E-529169 N-9601189	26	5,63	38	8,05	2	42 y 44	BHA
6	Frente a la plataforma CX-15	E-528983 N-9601327	26	5,85	38	8,04	1	147	TSA

Al respecto, es lógico que se haya logrado aislar un mayor número de cepas del medio de cultivo TSA que en BHA pues este último al carecer de una fuente convencional de carbono, se le añade petróleo, lo que restringe el crecimiento de varias cepas bacterianas pues pocas son capaces de usar dicha fuente de carbono, que es difícil de metabolizar; en cambio, el medio TSA contiene una fuente de

carbono fácilmente metabolizable, que le permite ser un medio no selectivo que propicia el crecimiento de diferentes cepas bacterianas (Britania, 2021; HiMedia, 2020)

#### 4.2. Caracterización de colonias bacterianas

De las 107 colonias aisladas y purificadas, se seleccionaron 27 al azar, para ser caracterizadas, en 23 de ellas fue posible la identificación molecular como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Cepas bacterianas identificadas molecularmente

Cepa	Identificación	Identidad en GenBank (%)
37	<i>Vibrio fluvialis</i>	99,80
38	<i>Vibrio fluvialis</i>	99,80
39	<i>Vibrio fluvialis</i>	100,00
42	<i>Vibrio</i> sp.	99,80
44	<i>Vibrio</i> sp.	100,00
45	<i>Vibrio</i> sp.	100,00
46	<i>Vibrio</i> sp.	100,00
36	<i>Pseudomonas</i> sp.	100,00
41	<i>Pseudomonas</i> sp.	100,00
43	<i>Pseudomonas</i> sp.	100,00
200	<i>Pseudomonas</i> sp.	99,46
78	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100,00
123	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,51
174	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100,00
178	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100,00
187	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,78
210	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,47
87	<i>Bacillus cereus</i>	99,92
98	<i>Bacillus cereus</i>	99,78
147	<i>Bacillus cereus</i>	99,47
124	<i>Bacillus subtilis</i>	100,00
108	<i>Acinetobacter schindleri</i>	99,78
176	<i>Pantoea dispersa</i>	100,00

Las características morfológicas de las colonias bacterianas se muestran en la tabla 6, Las colonias de las cepas bacterianas *Vibrio fluvialis*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter schindleri*, y *Pantoea*

*dispersa*, mostraron diferentes características, al ser cultivadas en medio TSA y BHA, siendo en su mayoría blancas cremosas, circulares de elevación convexa, algunas amarillas irregulares y otras cremas circulares; formaron diámetros entre un rango de 0,5 a 2 mm. Siendo características típicas de *Vibrio*, *Bacillus* y *Pseudomonas* entre otros géneros, al crecer en ambos medios como lo manifiestan Patiño et al. (2021), las colonias de forma circular con bordes ovalados y elipsoidal de dimensiones de 0,5 a 2 mm son características de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus* sp. como lo manifiestan Nápoles et al. (2019), Patiño et al. (2021), Rahman et al. (2007) y Vilela & Abasolo (2022).

Tabla 6. Características morfológicas de las colonias bacterianas seleccionadas.

Cepa	Especie	Medio	Forma	Tamaño (mm)	Color	Bordes	Elevación
36	<i>Pseudomonas</i> sp.	BHA	Circular	2,0	Blanco cremoso	Liso	Convexa
37	<i>Vibrio fluvialis</i>	TSA	Circular	2,0	Blanco cremoso	Liso	Convexa
38	<i>Vibrio fluvialis</i>	TSA	Irregular	2,0	Blanco cremoso	Ondulado	Convexa
39	<i>Vibrio fluvialis</i>	TSA	Circular	1,0	Blanco cremoso	Liso	Pulvinada
41	<i>Pseudomonas</i> sp.	BHA	Circular	0,5	Amarillo	Ondulado	Convexa
42	<i>Vibrio</i> sp.	BHA	Circular	0,5	Blanco cremoso	Liso	Convexa
43	<i>Pseudomonas</i> sp.	BHA	Circular	0,5	Blanco cremoso	Ondulado	Convexa
44	<i>Vibrio</i> sp.	BHA	Irregular	0,5	Crema	Liso	Convexa
45	<i>Vibrio</i> sp.	TSA	Circular	1,5	Crema	Ondulado	Convexo
46	<i>Vibrio</i> sp.	TSA	Circular	1,5	Crema	Ondulado	Convexo
78	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TSA	irregular	1,5	Blanco	Liso	Pulvinada
87	<i>Bacillus cereus</i>	TSA	Circular	1,5	Blanco cremoso	Liso	Convexa
98	<i>Bacillus cereus</i>	TSA	Irregular	1,5	Blanco cremoso	Liso	Pulvinada
106	ND	TSA	Irregular	1,5	Blanco cremoso	Liso	Pulvinada
108	<i>Acinetobacter schindleri</i>	TSA	Circular	1,0	Blanco cremoso	Liso	Convexa
123	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TSA	Circular	1,5	Blanco	Ondulado	Convexa
124	<i>Bacillus subtilis</i>	TSA	Circular	2,0	Blanco cremoso	Ondulado	Convexa
147	<i>Bacillus cereus</i>	TSA	Irregular	1,5	Blanco	Liso	Convexa
160	ND	TSA	Irregular	1,5	Blanco	Liso	Convexo
174	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TSA	Irregular	1,5	Blanco cremoso	Liso	Convexo
176	<i>Pantoea dispersa</i>	TSA	Irregular	1,5	Blanco cremoso	Liso	Convexo
178	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TSA	Circular	1,5	Blanco	Liso	Convexo
187	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TSA	Circular	1,5	Blanco	Ondulado	Irregular
200	<i>Pseudomonas</i> sp.	TSA	Circular	1,5	Blanco cremoso	Liso	Convexo
206	ND	TSA	Circular	1,5	Blanco cremoso	Liso	Convexo
208	ND	TSA	Irregular	1,5	Blanco cremoso	Liso	Convexo
210	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TSA	Irregular	1,5	Blanco	Ondulado	Irregular

#### 4.3 Caracterización de Gram, pruebas de catalasa y oxidasa

Las cepas mostraron ser en su mayoría bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos, algunos fueron cocos y cocobacilos. 13 cepas fueron catalasa positivas

y 14 negativas, así como la mayoría (19 cepas) fueron oxidasa positivas (tabla 7). Las características expuestas son distintivas de los géneros *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Acinetobacter* como lo mencionan Fernández et al. (2010), quienes además señalan que la identificación de bacterias se puede realizar con diferentes técnicas, pero que la más usual es la tinción de Gram; de la misma manera, Rahman et al. (2007), refieren que es típico identificar a las colonias bacterianas por su tamaño, forma y color.

Tabla 7. Caracterización de las cepas bacterianas a través de las pruebas Gram, catalasa y oxidasa.

Cepa	Especie	Forma	Tinción Gram	Prueba de catalasa	Prueba de oxidasa
36	<i>Pseudomonas</i> sp.	Bacilo	-	-	+
37	<i>Vibrio fluvialis</i>	Bacilo	-	-	+
38	<i>Vibrio fluvialis</i>	Bacilo	-	-	+
39	<i>Vibrio fluvialis</i>	Bacilo	-	-	+
41	<i>Pseudomonas</i> sp.	Bacilo	-	+	+
42	<i>Vibrio</i> sp.	Bacilo	-	-	+
43	<i>Pseudomonas</i> sp.	Bacilo	-	+	+
44	<i>Vibrio</i> sp.	Bacilo	-	-	+
45	<i>Vibrio</i> sp.	Bacilo	-	-	+
46	<i>Vibrio</i> sp.	Bacilo	-	-	+
78	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coco	+	+	-
87	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo	+	-	+
98	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo	+	-	+
106	ND	Bacilo	+	-	+
108	<i>Acinetobacter schindleri</i>	Bacilo	-	-	-
123	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coco	+	+	-
124	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo	+	+	+
147	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo	+	-	+
160	ND	Bacilo	+	-	+
174	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coco	+	+	-
176	<i>Pantoea dispersa</i>	Cocobacilo	-	+	+
178	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coco	+	+	-
187	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coco	+	+	-
200	<i>Pseudomonas</i> sp.	Bacilo	-	+	+
206	ND	Bacilo	-	+	+
208	ND	Coco	+	+	-
210	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coco	+	+	-

ND: No se pudo determinar la especie mediante identificación molecular.

Se observó que las cepas aisladas que fueron identificadas como pertenecientes al género *Pseudomonas* se mostraron como bacilos gram negativos, oxidasa positivos y casi todos catalasa negativos, a excepción de la cepa 36, estas

características de sus células bacterianas son propias de bacterias del género *Pseudomonas*, como lo precisaron Al-Bayati et al. (2021).

Por otra parte las características que mostraron las cepas aisladas del género *Vibrio*, fueron: bacilos gram negativos, oxidasa positivos, que son precisamente las características a esperarse en bacterias de dicho género como lo han especificado Alsina & Blanch (1994), las cepas aisladas fueron catalasa negativas, lo cual, a pesar que comúnmente el género *Vibrio* mayoritariamente son catalasa positivos (Rivera & Gándara, 2001), en algunos casos también pueden existir cepas catalasa negativas como lo han indicado Kesarcodi-Watson et al. (2009).

Respecto a las cepas de *Staphylococcus epidermidis* aisladas, sus células bacterianas tuvieron forma de coco, fueron gram positivas, catalasa positiva y oxidasa negativa, las cuales son características típicas para cepas de dicho género como las han reportado Wieser & Busse (2000).

Las cepas de *Bacillus* fueron bacilos gram positivos oxidasa positiva y en su mayoría catalasa negativos; se conoce que el género *Bacillus* cumple con dichas características, con la excepción que la mayoría de sus especies son catalasa positivas; a pesar de ello, no es imposible que ciertas cepas sean catalasa negativas, tal como las que se han observado en esta investigación; pues *Bacillus* catalasa negativo han sido reportados por Nicolaus et al. (1996).

La cepa de *Acinetobacter schindleri* se mostró como un bacilo gram negativo, catalasa y oxidasa negativo, características que corresponden a una bacteria de dicho género como señalaron Seleim et al. (2023)

La cepa de *Pantoea dispersa* se observó como un cocobacilo gram negativo catalasa positivo, que son características fenotípicas de bacterias de dicho género como lo han reportado Saticioglu et al. (2018).

En consecuencia, las características fenotípicas de las cepas bacterianas aisladas son compatibles con las que se esperaba de cepas de las correspondientes especies bacterianas identificadas molecularmente.

#### **4.4 Detección de genes oxigenasas en cepas bacterianas**

De las 107 cepas aisladas y purificadas a las que se les realizó la extracción de ADN se extrajo al azar 27, de las cuales se realizó la amplificación de los genes oxigenasas que codifican para enzimas degradadoras de petróleo, como fueron: xileno mono-oxigenasa, tolueno di-oxigenasa, naftaleno di-oxigenasa, etilbenceno,

naftaleno di-oxigenasa, bifenil di-oxigenasa, y benceno di-oxigenasa. En las 27 cepas seleccionadas se pudo detectar la presencia de genes de benceno di-oxigenasa, pues los *primers* específicos para dicho gen produjeron un producto de amplificación de alrededor de 200 pares de bases (pb) en 10 de las cepas, específicamente en las cepas 36 a 39 y 41 a 46) (figura 6a); así también se observó un producto de amplificación de alrededor de 800 pb en 17 cepas que fueron: 78, 87, 98, 106, 108, 123, 124, 147, 160, 174, 176, 178, 187, 200, 206, 208 y 210 (figura 6b); estos resultados son compatibles con los reportados por Ramírez et al. (2016), quienes también encontraron cepas bacterianas portadoras de genes de benceno di-oxigenasa en el manglar de Tumbes evidenciadas por PCR con productos de amplificación de 200 y 800 pb, similares a los observados en esta investigación. La investigación de Ramírez et al. (2016), se efectuó en el manglar tumbesino, que está relativamente cerca a la zona en estudio de esta investigación, por lo que confirma la existencia de cepas bacterianas degradadoras de petróleo en la zona costera de Tumbes.

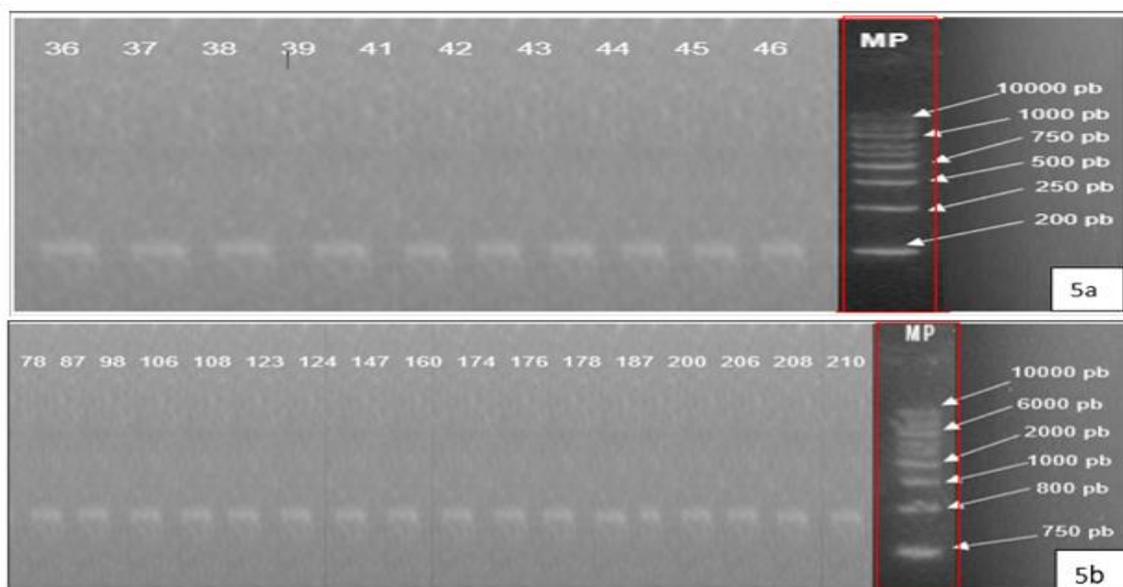


Figura 6. Gel de electroforesis de las cepas bacterianas para el gen benceno di-oxigenasa. a) Bandas fluorescentes indicadoras de un producto de amplificación de alrededor de 200 pb y b) Bandas fluorescentes indicadoras de un producto de amplificación de alrededor de 800 pb.

#### 4.5 Ensayo de biorremediación *in vitro*

De las 23 cepas bacterianas identificadas molecularmente, que fueron positivas para genes de benceno di-oxigenasas, se seleccionaron al azar 6 cepas: 87, 98, 124, 147, 123 y 176, para realizar el ensayo de biorremediación *in vitro*.

El ensayo tuvo ocho tratamientos, en seis de ellos se aplicaron por separado las cepas seleccionadas, en otro se aplicó las seis cepas como un consorcio y en el tratamiento control no se aplicó cepas bacterianas.

Los mejores resultados de biodegradación *in vitro* se observó en las cepas de *Bacillus cereus* (cepas 87, 98, y 147)(Figura 7A, 7B y 7C) así como en la cepa de *Bacillus subtilis* (cepa 124) (Figura 7D) en los que se observó una mayor separación de fases de la película del petróleo en cada matraz; en tanto que las cepas que mostraron la menor biodegradación fueron la cepa de *Staphylococcus epidermidis* (cepa 123) (Figura 7E) y de *Pantoea dispersa* (cepa 176)(Figura 7F) además se obtuvieron resultados bastante buenos con el consorcio (*mix*) de las cepas antes mencionadas (Figura 7G) así como con las cepas 98-40 (cepa 98 de las cuales se sembraron 40 colonias) y 98-20 (cepa 98 de las cuales se sembraron 20 colonias) (Figura 7H), en todos los casos se observó que la degradación de petróleo fue mayor en los tratamientos con bacterias que en el tratamiento control; pues en los matraces con bacterias se apreció turbidez que es un indicador de crecimiento bacteriano, así como disminución de viscosidad y emulsificación, mostrándose el medio de cultivo semi claro que indicó consumo de hidrocarburos por las diferentes cepas bacterianas.

Al finalizar el ensayo *in vitro* se determinó el crecimiento de las cepas mediante conteo en placas petri con medios de cultivo plate count agar (PCA) y Bushnell Haas agar (BHA) como se indica en la tabla 8 y figura 7. Apreciándose que las cepas con mayores crecimientos fueron la cepa 98 (*B. cereus*) y las 123 (*S. epidermidis*), mientras que las de menor crecimiento fueron la cepa 176 (*P. dispersa*) y 87 (*B. cereus*), lo que muestra que no hay una correlación entre el crecimiento bacteriano y su eficacia degradadora de petróleo, por cuanto mientras que la cepa 87 (*B. cereus*) mostró la mayor degradación, tuvo comparativamente un bajo crecimiento, en tanto que la cepa 123 (*S. epidermidis*) tuvo alto crecimiento pero bajo poder de degradación

Tabla 8. Conteo de bacterias cultivadas en medio plate count agar y Bushnell Haas agar

Cepa	Conteo (UFC/ml)
87	16 000
98	29 500
123	28 000
124	23 000
147	24 000
176	8 000

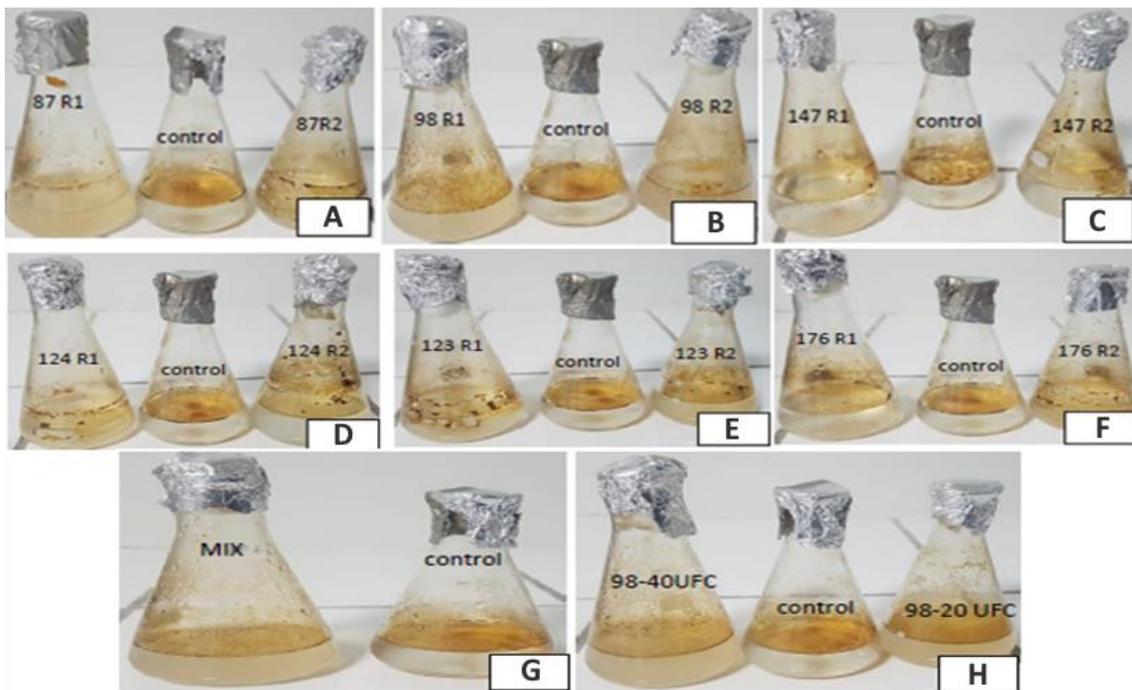


Figura 7. Ensayo de biorremediación in vitro de las cepas bacterianas seleccionadas. A), B), C) y D) muestran las cepas con mejores resultados de degradación: cepas 87, 98 y 147 de *B. cereus* y cepa 124 de *B. subtilis*. E), F) y G) muestran las cepas con resultado más modesto

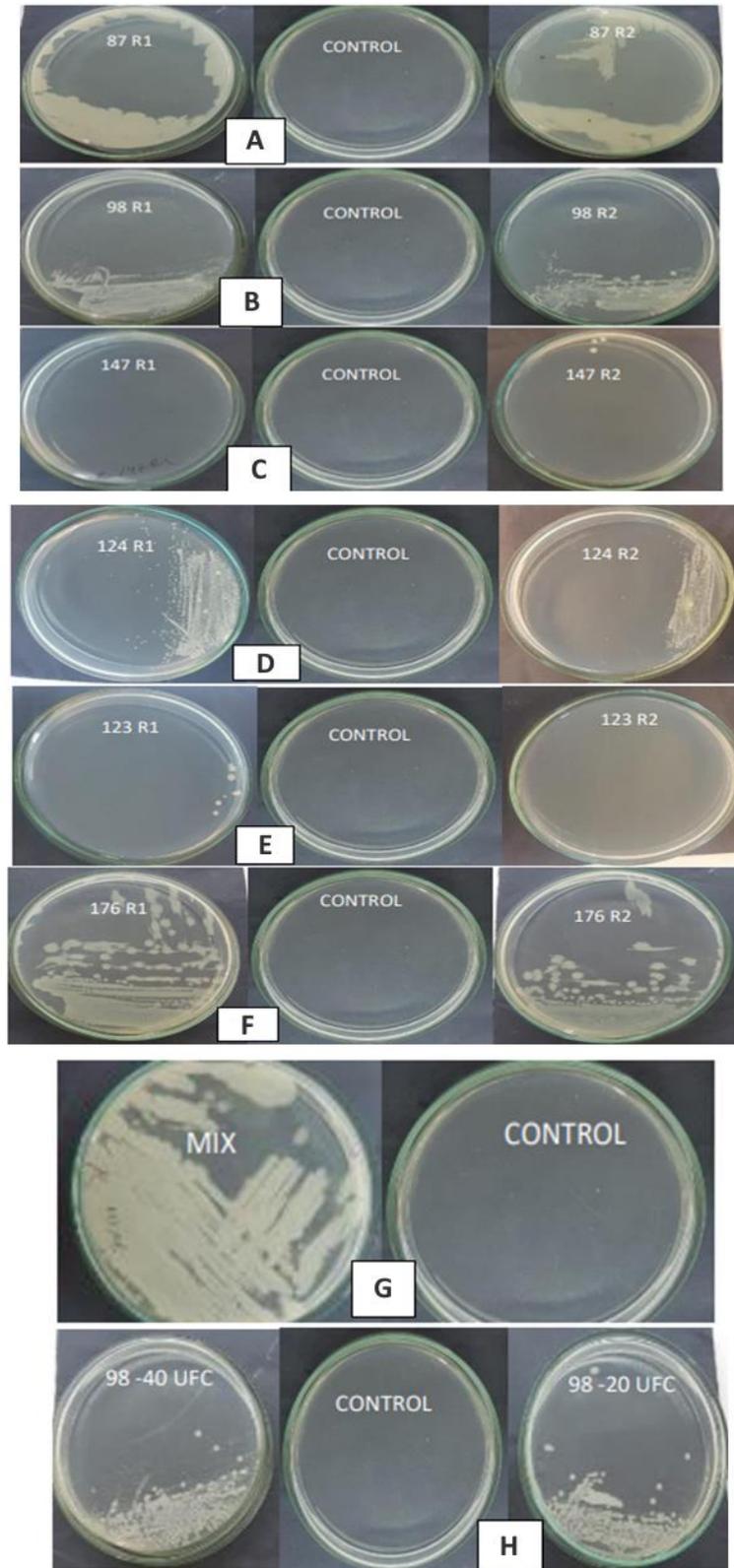


Figura 8. Crecimiento en placas de las cepas bacterianas seleccionadas en la biorremediación *in vitro*. A), B), C) y D) muestran los resultados del conteo de las UFC 87, 98 y 147 de *B. cereus* y cepa 124 de *B. subtilis*. E), F), G) y H) los correspondientes a las cepas 123, 176, mix y 98.

El haber evidenciado que cepas de *Bacillus* y de *Staphylococcus*, tuvieran poder biorremediador de petróleo, no es un hecho inusual pues estos géneros habitualmente han sido reportados como degradadoras de hidrocarburos (Castillo et al., 2020; Palacios & Zambrano, 2023).

Adicionalmente, se ha observado que el crecimiento de las cepas bacterianas en el medio con petróleo no tuvo mucha relación con la degradación que produjeron de éste, lo cual puede explicarse porque ciertas cepas producen otras sustancias además de las enzimas de biodegradación, tales como biosurfactantes que permiten emulsionar el petróleo, haciéndolo más soluble y por ende más biodisponible (Muras et al., 2021; Rabelo & Márquez, 2022; Vilela & Abasolo, 2022). Por otro lado, las cepas de *Bacillus* tales como *Bacillus cereus* (cepas 87, 98, y 147) y de *Bacillus subtilis* (cepa 124), mostraron el mayor poder biodegradador en el ensayo *in vitro*, lo cual es compatible con lo hallado en otros estudios como los de Palacios & Zambrano (2023), Rabodonirina et al. (2019) y (Das & Mukherjee, 2007), entre otros, en los cuales cepas de *Bacillus* también mostraron el mayor poder de degradación de petróleo; esto también se explica porque ciertas cepas de *Bacillus*, en especial *B. cereus* y *B. subtilis* poseen varios genes que codifican para enzimas del catabolismo de hidrocarburos aromáticos así como de surfactantes (Durval et al., 2020; Singha & Pandey, 2021), lo que les otorga mayor poder de biodegradación de hidrocarburos.

#### **4.6 Ensayo de biorremediación a mayor escala**

El agua de mar mezclada con 25 ml de cepas bacterianas más 0,5% de crudo de petróleo mesa 30, tuvo una concentración promedio inicial de 4856,48 mg/l de HTP. Pasado 30 días, tiempo que duró el experimento a mayor escala, los tratamientos; T<sub>2</sub> con el consorcio de cepas bacterianas 87, 98, 124, y 147 (correspondientes a *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*), T<sub>3</sub> con el consorcio de cepas bacterianas 87, 98, 124, 147, 123 y 176 (correspondientes a los géneros *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* y *Pantoea dispersa*), T<sub>4</sub> con una sola cepa, la 87 (de la especie *Bacillus cereus*) produjeron respectivamente una biodegradación de 99,96%, 99,68%, 99,57% de la concentración inicial de los HTP, El análisis estadístico (anexos 4, 5 y 6) indicó que no hubo diferencia estadística significativa entre los tratamientos, mostrando que los tratamientos en los que se aplicó las

cepas biorremediadoras solas o en consorcio tuvieron los mismos resultados que en el tratamiento control en el que no se aplicó las cepas (tabla 9).

Tabla 9. Análisis de hidrocarburos totales de petróleo en el agua de mar en el ensayo de mayor escala

Tratam.	Código de la cepa	Concentración de HTP (mg/l)		Biodegradación	
		Inicial	Final	mg/l	%
T1	Control	3968,94±1620,68	3,45±0,39	3965,49±1620,20	99,90±0,05 <sup>a</sup>
T2	87,98,124,147 ( <i>Bacillus cereus</i> y <i>subtilis</i> )	7864,87±2043,45	3,38±1,69	7861,48±2042,44	99,96±0,01 <sup>a</sup>
T3	87,98,124,147 ( <i>Bacillus cereus</i> y <i>subtilis</i> ); 123 y 176 ( <i>Staphylococcus epidermis</i> y <i>Pantoea dispersa</i> )	4816,81±3203,24	14,03±8,95	4802,79±3196,63	99,68±0,17 <sup>a</sup>
T4	98 ( <i>Bacillus cereus</i> )	2775,33±1490,19	10,01±5,97	2765,32±1489,40	99,57±0,39 <sup>a</sup>

\* Las letras que acompañan al porcentaje de biodegradación indican al ser iguales, que no existió diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos.

La razón por la cual la biodegradación observada en los tratamientos con las cepas biorremediadoras fue estadísticamente la misma que la observada en el control, puede deberse a que no fue posible esterilizar el agua para asegurarse de que la flora bacteriana propia de dicha agua fuera totalmente eliminada, esto debido a que los altos volúmenes de agua empleados en el ensayo (50 l por cada tanque) hizo técnicamente imposible realizar la esterilización; si bien el agua fue desinfectada con hipoclorito de sodio al 5% antes de iniciar el ensayo, pudieron haber quedado esporas bacterianas que germinaran luego y restauraran la comunidad bacteriana original, entre las cuales pudieron haber cepas degradadoras de hidrocarburos, puesto que como han afirmado Castillo-Márquez et al. (2023) y Julián & Rivero (2023), varias de las cepas nativas de ambientes acuáticos tienen la capacidad de metabolizar los hidrocarburos presentes en el petróleo; hecho que sustenta la técnica de biorremediación denominada bioestimulación que consiste en aportar nutrientes a las comunidades bacterianas nativas para facilitarles su labor de biodegradación (Julián & Rivero, 2023), esta bioestimulación pudo darse en este caso, en el ensayo realizado, porque en el tratamiento control se aplicó medio de cultivo estéril que aportó nutrientes al agua.

Sin embargo, la capacidad biorremediadora de las cepas bacterianas cultivadas empleadas en esta investigación, nuevamente quedó en evidencia, pues así como ocurrió en el ensayo *in vitro*, en este ensayo a mayor escala, nuevamente pudieron

degradar casi por completo los 250 ml de petróleo que se agregaron en cada tanque (degradación superior al 99%).

## V. CONCLUSIONES

- 1) De las zonas en estudio (línea de playa y mar adyacente a la plataforma petrolera CX-11), se lograron aislar 107 cepas bacterianas capaces de crecer en medio que tuvo como única fuente de carbono al petróleo. De éstas, 23 pudieron ser identificadas molecularmente, y correspondieron: tres a *Vibrio fluvialis*, cuatro a *Vibrio* spp., cuatro a *Pseudomonas* spp., seis a *Staphylococcus epidermidis*, tres a *Bacillus cereus*, una a *Bacillus subtilis*, una a *Acinetobacter schindleri* y una a *Pantoea dispersa*.
- 2) En 27 cepas, entre las que se encontraban las 23 cepas identificadas molecularmente se confirmó la presencia de genes responsables de la degradación de petróleo, específicamente genes de benceno di-oxigenasa.
- 3) En el ensayo *in vitro*, se observó que las cepas de *Bacillus cereus* (cepas 87, 98, y 147) así como la cepa de *Bacillus subtilis* (cepa 124) mostraron mayor poder degradador de petróleo; en tanto que las cepas con menor poder fueron la cepa de *Staphylococcus epidermidis* (cepa 123) y de *Pantoea dispersa* (cepa 176); además se obtuvieron resultados bastante buenos con el consorcio (*mix*) de las cepas antes mencionadas, así como con las cepas 98-40 (cepa 98 de las cuales se sembraron 40 colonias) y 98-20 (cepa 98 de las cuales se sembraron 20 colonias). En todos los casos se observó que la degradación de petróleo fue mayor en los tratamientos con cepas bacterianas que en el tratamiento control que no tuvo cepas bacterianas.
- 4) En el ensayo a mayor escala, en tanques con 50 l de agua de mar, luego de 30 días de experimentación, los tratamientos; T2 (consorcio de cepas de *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*: 87, 98, 124 y 147), T3 (consorcio de cepas de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* y *Pantoea dispersa*: 87, 98, 124, 147, 123 y 176), T4 (cepa de *Bacillus cereus* 87) produjeron respectivamente una biodegradación de 99,96%, 99,68%, 99,57% de la concentración inicial de los HTP, mostrando su alto poder degradador de petróleo. Sin embargo, el tratamiento control (sin cepas añadidas) tuvo una

biodegradación estadísticamente similar, probablemente por cepas autóctonas que fueron bioestimuladas y degradaron el petróleo.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- 1) Realizar nuevo ensayo de biorremediación a mayor escala, caracterizando mediante análisis metagenómico la comunidad bacteriana que viene en el agua de mar usada para dicho ensayo, comparando la misma al inicio y al final del ensayo, a fin de determinar si dicha población nativa es capaz de biodegradar petróleo y cómo el petróleo afecta a la composición de la comunidad bacteriana.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Bayati, S. S., Al-Ahmer, S. D., Shami, A.-M. M., & Al-Azawi, A. H. (2021). Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical samples. *Biochemical and Cellular Archives*, 21(2), 3931-3935.
- Alsina, M., & Blanch, A. R. (1994). A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(1), 79-85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04419.x>
- Ángeles, R. (2015). *Evaluación de la degradación de hidrocarburos en microcosmos de manglares utilizando la técnica de bioestimulación* [Tesis de Maestra en Ciencias del Ambiente, Universidad Veracruzana]. <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/41927/AngelesToresRoxane.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Austermühle, S. (2010). *Historia de derrames de petróleo en el Perú*. ONG Grupo Mundo Azul.
- Avila, D. L. (2016). *Aislamiento y selección de un cultivo bacteriano puro degradador de hidrocarburos a partir de botaderos de residuos de petróleo en Talara en enero del 2016*. [Tesis de Biólogo-Microbiólogo, Universidad Nacional de Trujillo]. <https://hdl.handle.net/20.500.14414/9011>
- Bravo, P. (2018). *Bacterias asociadas a muestras de sedimentos y zooplancton en el Golfo de México* [Tesis de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada]. <https://cicese.repositorioinstitucional>.

mx/jspui/bitstream/1007/2517/1/tesis\_Bravo%20Ba%c3%a1s\_%20Pablo\_15\_oct\_2018.pdf

- Britania. (2021). *Tripteína soya agar*. Britania. [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6054e7678b1e3.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e7678b1e3.pdf)
- Çardak, M., Altug, G., Çiftçi Türetken, P., & Sevan, G. (2007). PAH degradation effects of some bacteria isolated from the Istanbul Strait and soil of Batman Oil Refinery. *Proc. of 8th CIESM Congress, Turkey*, 38, 358. [https://www.researchgate.net/publication/288002758\\_PAH\\_Degradation\\_Effects\\_Of\\_Some\\_Bacteria\\_Isolated\\_From\\_The\\_Istanbul\\_Strait\\_And\\_Soil\\_Of\\_Batman\\_Oil\\_Refinery](https://www.researchgate.net/publication/288002758_PAH_Degradation_Effects_Of_Some_Bacteria_Isolated_From_The_Istanbul_Strait_And_Soil_Of_Batman_Oil_Refinery)
- Castillo, R. T., More, F. J., Cornejo, M., Fernández, J. N., Mialhe, E. L. (2020). Aislamiento de bacterias con potencial biorremediador y análisis de comunidades bacterianas de zona impactada por derrame de petróleo en Condorcanqui – Amazonas – Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 22(3), 2015-2225. <https://doi.org/10.18271/ria.2020.656>
- Castillo-Márquez, R. C., Treviño-Carreón, J., López-Santillán, J. A., Osorio-Hernández, E., Poot-Poot, W. A., & Estrada-Drouaillet, B. (2023). Importancia de las bacterias nativas de ambientes acuáticos afectados por derrames de petróleo. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 88, Article 88. <https://doi.org/10.33064/iycuaa2023883999>
- Cerqueda-García, D., García-Maldonado, J. Q., Aguirre-Macedo, L., & García-Cruz, U. (2020). A succession of marine bacterial communities in batch reactor experiments during the degradation of five different petroleum types. *Marine*

- Pollution Bulletin*, 150, 110775. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110775>
- Dai, X., Lv, J., Yan, G., Chen, C., Guo, S., & Fu, P. (2020). Bioremediation of intertidal zones polluted by heavy oil spilling using immobilized laccase-bacteria consortium. *Bioresource Technology*, 309, 123305. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123305>
- Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98(7), 1339-1345. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.032>
- Defensoría del Pueblo. (2014). *Defensoría del Pueblo constató derrame de petróleo en mar de Tumbes y exhorta a autoridades a actuar con celeridad*. Defensoria del Pueblo - Perú. <https://www.defensoria.gob.pe/defensoria-del-pueblo-constato-derrame-de-petroleo-en-mar-de-tumbes-y-exhorta-a-autoridades-a-actuar-con-celeridad/>
- Durval, I. J. B., Mendonça, A. H. R., Rocha, I. V., Luna, J. M., Rufino, R. D., Converti, A., & Sarubbo, L. A. (2020). Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 157, 111357. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111357>
- Fernandes, C., Khandeparker, R. D. S., & Shenoy, B. D. (2020). High abundance of *Vibrio* in tarball-contaminated seawater from Vagator beach, Goa, India. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110773. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110773>

- Fernández, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en microbiología clínica*. <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Geolab SRL. (2011). *Estudio de impacto ambiental para el proyecto de instalación de la plataforma marina CX-15 y facilidades de producción para la exploración y producción de 24 pozos en el yacimiento corvina -lote Z-1, región Tumbes*. GeoLab SRL. <http://www.minem.gob.pe/minem/archivos/file/DGGAE/ARCHIVOS/estudios/EIAS%20-%20hidrocarburos/EIA/EIA%20CX-15.pdf>
- Gómez, M. L., Vivas, L. J., Ruiz R, R. A., Reyes D, V. R., & Hurtado, C. A. (2006). *Bacterias marinas nativas degradadoras de compuestos orgánicos persistentes en Colombia*.
- Guevara, H., Garrido, J., Kostelac, A., Valdivia, K., Mascco, A., & Garay, A. (2010). *Estudio de Impacto Ambiental Proyecto de factibilidad de producción del yacimiento Corvina, Lote Z-1 Tumbes*. BPZ Exploración & Producción S.R.L. <https://minem.gob.pe/minem/archivos/file/DGAAH/IGAS%20LOTE%20Z-1/1847932.zip>
- Hamdan, H. Z., Salam, D. A., & Saikaly, P. E. (2019). Characterization of the microbial community diversity and composition of the coast of Lebanon: Potential for petroleum oil biodegradation. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110508. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110508>
- HiMedia. (2020). *Bushnell Haas agar*. Hi Media. <https://www.himedialabs.com/media/TD/M349.pdf>

- Julián, A. M., & Rivero, J. F. (2023). Biorremediación de agua y suelo contaminados por residuos orgánicos de petróleo en Iquitos. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(5), 7936-7968. [https://doi.org/10.37811/cl\\_rcm.v7i5.8376](https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i5.8376)
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2009). Two pathogens of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius* -like isolate. *Journal of Fish Diseases*, 32(6), 499-507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01006.x>
- Ławniczak, Ł., Woźniak-Karczewska, M., Loibner, A. P., Heipieper, H. J., & Chrzanowski, Ł. (2020). Microbial Degradation of Hydrocarbons—Basic Principles for Bioremediation: A Review. *Molecules*, 25(4), 856. <https://doi.org/10.3390/molecules25040856>
- Lee, D. W., Lee, H., Kwon, B.-O., Khim, J. S., Yim, U. H., Kim, B. S., & Kim, J.-J. (2018). Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environmental Pollution*, 241, 254-264. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.070>
- Liu, X., Liu, M., Zhou, L., Hou, L., Yang, Y., Wu, D., Meadows, M. E., Li, Z., Tong, C., & Gu, J. (2021). Occurrence and distribution of PAHs and microbial communities in nearshore sediments of the Knysna Estuary, South Africa. *Environmental Pollution*, 270, 116083. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116083>
- Logeshwaran, P., Megharaj, M., Chadalavada, S., Bowman, M., & Naidu, R. (2018). Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based

- remediation approaches. *Environmental Technology & Innovation*, 10, 175-193. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.001>
- Muras, A., Romero, M., Mayer, C., & Otero, A. (2021). Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(4), 609-627. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1873239>
- Nápoles, J., Bahín, L., Gutiérrez, M., Del Toro, D., Abalos, A., Nápoles, J., Bahín, L., Gutiérrez, M., Del Toro, D., & Abalos, A. (2019). Degradación de diesel en agua de mar utilizando un consorcio bacteriano. *Tecnología Química*, 39(2), 403-420.
- Nicolaus, B., Lama, L., Esposito, E., Manca, M. C., Gambacorta, A., & Prisco, G. Di. (1996). "*Bacillus thermoantarcticus*" sp. Nov., from Mount Melbourne, Antarctica: A novel thermophilic species. *Polar Biology*, 16(2), 101-104. <https://doi.org/10.1007/BF02390430>
- Palacios, D. M., & Zambrano, M. C. (2023). *Evaluación de la degradación de diésel mediante Bacillus sp. Antárticos* [Tesis de Ingeniera Ambiental, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López]. <http://repositorio.esпам.edu.ec/handle/42000/2134>
- Patiño, O., Robles, H., & León, L. (2021). Biodegradación de petróleo por *Bacillus thuringiensis* como alternativa para la recuperación de suelos agrícolas. *Arnaldoa*, 28(2), 339-348. <http://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.282.28205>
- Peralta, R., Peralta, T., & Ordinola-Zapata, A. (2021). Caracterización de cepas de *Vibrio* spp. biorremediadoras de petróleo aisladas de agua marina. *Manglar*, 18(1), 21-26. <https://doi.org/10.17268/manglar.2021.003>
- Perdigão, R., Almeida, C. M. R., Santos, F., Carvalho, M. F., & Mucha, A. P. (2020). Optimization of an autochthonous bacterial consortium obtained from beach

- sediments for bioremediation of petroleum hydrocarbons. *Water*, 13(1), 66. <https://doi.org/10.3390/w13010066>
- Pi, Y., Meng, L., Bao, M., Sun, P., & Lu, J. (2016). Degradation of crude oil and relationship with bacteria and enzymatic activities in laboratory testing. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 106, 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.015>
- Plata, K. (2023). *Diseño de un consorcio bacteriano sintético degradador de petróleo crudo* [Tesis de Maestro en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos]. <http://riaa.uaem.mx/xmlui/handle/20.500.12055/4075>
- Pulido, V., Escobar-Mamani, F., Arana, C., & Olivera, E. (2022). Efectos del derrame de petróleo en la Refinería la Pampilla en las costas del litoral marino, Lima (Perú). *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 24(1), 5-8. <https://doi.org/10.18271/ria.2022.411>
- Rabelo, R. A., & Márquez, M. A. (2022). Bacterias Gram negativas biodegradadoras de hidrocarburos. *Revista de Ciencias*, 24(2), e9935. <https://doi.org/10.25100/rc.v24i2.9935>
- Rabodonirina, S., Rasolomampianina, R., Krier, F., Drider, D., Merhaby, D., Net, S., & Ouddane, B. (2019). Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites. *Journal of Environmental Management*, 232, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.005>
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., Banat, I. M., Lord, R., & Street, G. (2007). Bioremediation of petroleum sludge using bacterial consortium with biosurfactant. En S. N. Singh & R. D. Tripathi (Eds.), *Environmental*

- Bioremediation Technologies* (pp. 391-408). Springer Berlin Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-540-34793-4\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-540-34793-4_17)
- Ramírez, B. E., Hidalgo, A., Ordinola, A., Vieyra, E. G., Palacios, P., & Ordinola, J. (2016). Eficiencia de cepas bacterianas aisladas del manglar para biorremediar suelos contaminados con petróleo. *Química Viva*, 15(1), 20-30.
- Rivera, S. A. H., & Gándara, J. M. (2001). Aislamiento y caracterización de bacterias del género *Vibrio* de aguas contaminadas por hidrocarburos. *Foresta Veracruzana*, 3(1), 17-21.
- Sakthipriya, N., Doble, M., & Sangwai, J. S. (2015). Bioremediation of coastal and marine pollution due to crude oil using a microorganism *Bacillus subtilis*. *Procedia Engineering*, 116, 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.08.284>
- Saticioglu, I. B., Duman, M., & Altun, S. (2018). Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Pantoea agglomerans* isolated from rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ) fry. *Microbial Pathogenesis*, 119, 131-136. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.022>
- Seleim, S. M., El-Massih, A., Mona, A., Saleh, M. H., & El-Wakil, D. M. (2023). Biofilm formation by acinetobacter species isolated from intensive care units: Unveiling the impact on antibiotic resistance. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 32(4), 33-43.
- Singha, L. P., & Pandey, P. (2021). Rhizosphere assisted bioengineering approaches for the mitigation of petroleum hydrocarbons contamination in soil. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(5), 749-766. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1888066>

- Vilela, J. R., & Abasolo, F. (2022). *Bacterias biotransformadoras de hidrocarburos y metales pesados*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/6735>
- Viñas, M. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: Caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica* [Tesis de Doctor en Biología, Universitat de Barcelona]. [https://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/42392/1/TESIS\\_MVINAS\\_CANALS.pdf](https://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/42392/1/TESIS_MVINAS_CANALS.pdf)
- Wieser, M., & Busse, H. J. (2000). Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 1087-1093. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1087>

## **ANEXOS**

Anexo 1. Informe del análisis del contenido de hidrocarburos totales al inicio de la investigación.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
LABORATORIO LABICER  
ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN



**INFORME DE ENSAYO N° 1266 – 23 – LABICER**

- 1. DATOS DEL CLIENTE**
  - 1.1. NOMBRE / RAZÓN SOCIAL : UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
  - 1.2. D.N.I / R.U.C. : 20177689051
  - 1.3. DIRECCIÓN : CIUDAD UNIVERSITARIA NRO. S/N (BARRIO PAMPA GRANDE) TUMBES
- 2. CRONOGRAMA DE FECHAS**
  - 2.1. FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA : 05 / 10 / 2023
  - 2.2. FECHA DE EJECUCIÓN DEL ENSAYO : 16 / 10 / 2023
  - 2.3. FECHA DE EMISIÓN DEL INFORME : 27 / 10 / 2023
- 3. ANÁLISIS SOLICITADO** : ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO
- 4. DATOS DE LA MUESTRA**
  - 4.1. TIPO DE MUESTRA : AGUA
  - 4.2. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA : 12 MUESTRAS DE AGUA DE MAR CONTAMINADAS CON PETRÓLEO CRUDO
  - 4.3. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN : PRODUCCIÓN DE UN BIORREMEDIADOR EN BASE A BACTERIAS NATIVAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS PRESENTES EN EL MAR Y MANGLAR DE TUMBES.

MUESTRA	DESCRIPCIÓN
M1	Agua de mar contaminada con petróleo crudo / T1-R1
M2	Agua de mar contaminada con petróleo crudo / T1-R2
M3	Agua de mar contaminada con petróleo crudo / T1-R3
M4	Agua de mar contaminada con petróleo crudo / T2-R1
M5	Agua de mar contaminada con petróleo crudo / T2-R2
M6	Agua de mar contaminada con petróleo crudo / T2-R3
M7	Agua de mar contaminada con petróleo crudo / T3-R1
M8	Agua de mar contaminada con petróleo crudo / T3-R2
M9	Agua de mar contaminada con petróleo crudo / T3-R3
M10	Agua de mar contaminada con petróleo crudo / T4-R1
M11	Agua de mar contaminada con petróleo crudo / T4-R2
M12	Agua de mar contaminada con petróleo crudo / T4-R3

- 4.3. OBSERVACIONES (SI APLICA) : ENVASE DE VIDRIO
- 5. LUGAR DE RECEPCIÓN Y ANÁLISIS** : LABORATORIO LABICER-UNI
- 6. CONDICIONES AMBIENTALES** : Temperatura: 22.1 °C; Humedad relativa: 64 %



7. RESULTADOS

PARÁMETRO	MUESTRA	RESULTADO	UNIDADES	MÉTODO DE REFERENCIA <sup>(1)</sup>
Hidrocarburos totales de petróleo (HTP)	M1	2151.52	mg HTP/L agua de mar	Extracción: EPA Method 3510C  Análisis: Gravimetría
	M2	4491.15		
	M3	5264.10		
	M4	10156.96		
	M5	7203.86		
	M6	6233.74		
	M7	3418.78		
	M8	2549.14		
	M9	8482.52		
	M10	2186.71		
	M11	4469.93		
	M12	1669.35		

<sup>(1)</sup>Método de ensayo de referencia o técnica aceptada por el cliente.

<sup>(2)</sup>Resultados de HTP con corrección de blanco (agua de mar sin contaminar, con 1.24 mg HTP/L).

8. VALIDEZ DEL INFORME DE ENSAYO

Los resultados del informe de ensayo sólo son válidos para la(s) muestra(s) ensayadas, descrita(s) en el ítem 4 del presente documento.

  
Bach. Jesús Utano Reyes  
Analista Químico  
LABICER-UNI



  
M.Sc. Ily Marilú Maza Mejía  
Jefe de Laboratorio  
CQP 1149

NOTAS:

- LABICER-UNI no se responsabiliza del muestreo ni de la procedencia de la muestra.
- LABICER-UNI no se hace responsable de la información proporcionada por el cliente, incluidos en los ítems 1 y del 4.1 al 4.2 del presente documento.
- Los resultados de los ensayos obtenidos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.
- Este documento carece de validez sin sello y firmas correspondientes.

Anexo 2. Informe del análisis del contenido de hidrocarburos totales al final de la investigación.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
LABORATORIO LABICER  
ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN



**INFORME DE ENSAYO N° 1359 – 23 – LABICER**

- 1. DATOS DEL CLIENTE**
- 1.1. NOMBRE / RAZÓN SOCIAL : UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES  
1.2. D.N.I / R.U.C. : 20177689051  
1.3. DIRECCIÓN : CIUDAD UNIVERSITARIA NRO. S/N (BARRIO PAMPA GRANDE) TUMBES.
- 2. CRONOGRAMA DE FECHAS**
- 2.1. FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA : 02 / 11 / 2023  
2.2. FECHA DE EJECUCIÓN DEL ENSAYO : 08 / 11 / 2023  
2.3. FECHA DE EMISIÓN DEL INFORME : 10 / 11 / 2023
- 3. ANÁLISIS SOLICITADO** : ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO
- 4. DATOS DE LA MUESTRA**
- 4.1. TIPO DE MUESTRA : AGUA  
4.2. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA : 12 MUESTRAS PROCESADAS DE AGUA DE MAR CONTAMINADAS CON PETRÓLEO CRUDO  
4.3. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN : PRODUCCIÓN DE UN BIORREMEDIADOR EN BASE A BACTERIAS NATIVAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS PRESENTES EN EL MAR Y MANGLAR DE TUMBES.

MUESTRA	DESCRIPCIÓN
M1	Agua de mar procesada / T1-R1
M2	Agua de mar procesada / T1-R2
M3	Agua de mar procesada / T1-R3
M4	Agua de mar procesada / T2-R1
M5	Agua de mar procesada / T2-R2
M6	Agua de mar procesada / T2-R3
M7	Agua de mar procesada / T3-R1
M8	Agua de mar procesada / T3-R2
M9	Agua de mar procesada / T3-R3
M10	Agua de mar procesada / T4-R1
M11	Agua de mar procesada / T4-R2
M12	Agua de mar procesada / T4-R3

- 4.3. OBSERVACIONES (SI APLICA) : ENVASE DE VIDRIO
- 5. LUGAR DE RECEPCIÓN Y ANÁLISIS** : LABORATORIO LABICER-UNI
- 6. CONDICIONES AMBIENTALES** : Temperatura: 22.0 °C; Humedad relativa: 65 %



7. RESULTADOS

PARÁMETRO	MUESTRA	RESULTADO	UNIDADES	MÉTODO DE REFERENCIA <sup>(1)</sup>
Hidrocarburos totales de petróleo (HTP)	M1	3.36	mg HTP/L agua de mar	Extracción: EPA Method 3510C  Análisis: Gravimetría
	M2	3.87		
	M3	3.11		
	M4	4.15		
	M5	4.55		
	M6	1.45		
	M7	5.67		
	M8	12.94		
	M9	23.47		
	M10	3.28		
	M11	12.11		
	M12	14.65		

<sup>(1)</sup> Método de ensayo de referencia o técnica aceptada por el cliente.

<sup>(2)</sup> Resultados de HTP con corrección de blanco (agua de mar sin contaminar, con 1.24 mg HTP/L).

8. VALIDEZ DEL INFORME DE ENSAYO

Los resultados del informe de ensayo sólo son válidos para la(s) muestra(s) ensayadas, descrita(s) en el ítem 4 del presente documento.



Bach. Jesús Utano R.  
Analista  
LABICER – UNI

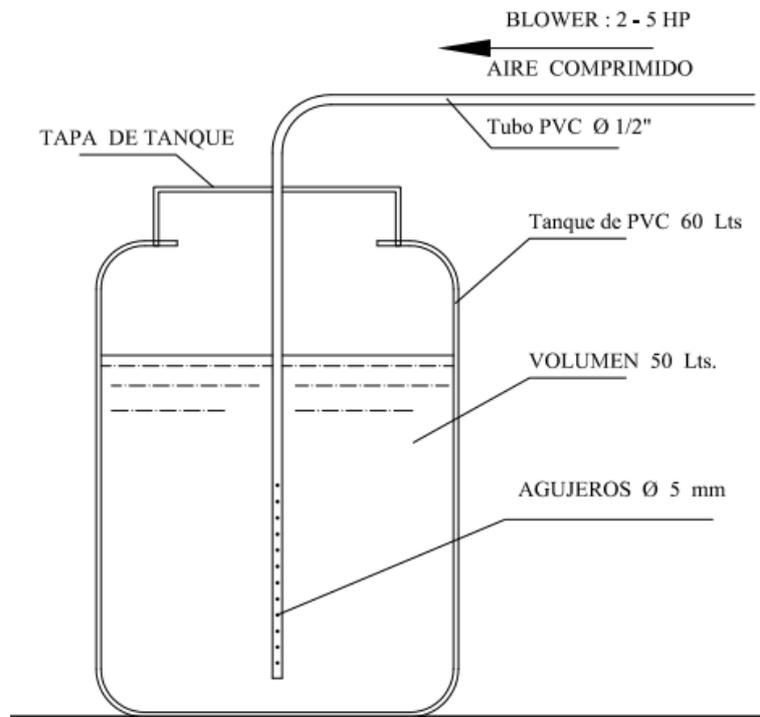



M.Sc. Ily Marilú Maza Mejía  
Jefe de Laboratorio  
CQP 1149

NOTAS:

- LABICER-UNI no se responsabiliza del muestreo ni de la procedencia de la muestra.
- LABICER-UNI no se hace responsable de la información proporcionada por el cliente, incluidos en los ítems 1 y del 4.1 al 4.2 del presente documento.
- Los resultados de los ensayos obtenidos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.
- Este documento carece de validez sin sello y firmas correspondientes.

Anexo 3. Diseño de uno de los tanques y conexiones empleados en el ensayo de biorremediación a mayor escala.



Anexo 4. Análisis de varianza para el porcentaje de reducción de HTP en el ensayo de biorremediación en mayor escala

Cuadro de análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F <sub>calculado</sub>	Significancia (p)
Tratamiento	3	0,304	0,101	2,177	0,169
Error	8	0,373	0,047		
Total	11	0,677			

Anexo 5. Prueba de Duncan para el porcentaje de reducción de HTP en el ensayo de biorremediación en mayor escala

Prueba de Duncan

Tratamiento	Promedio	Significación
T2	99,9600	A
T1	99,8967	A
T3	99,6800	A
T4	99,5667	A

Anexo 6. Prueba de Tukey para el porcentaje de reducción de HTP en el ensayo de biorremediación en mayor escala.

Prueba de Tukey

Tratamiento	Promedio	Significación
T2	99,9600	A
T1	99,8967	A
T3	99,6800	A
T4	99,5667	A