Biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo mediano en biopilas utilizando un consorcio microbiano mixto a escala semipiloto

Mábel Sofía Barrera Ayala

Trabajo de Grado para Optar el Título de Magíster en Microbiología

Director
German Alexis Zafra Sierra
Doctor en Ciencias en Biotecnología

Codirectora
Diana Verónica Cortés Espinosa
Doctora en Biotecnología

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Salud
Escuela de Microbiología
Maestría en Microbiología
Bucaramanga
2026

"The decisions I made after that moment were not the ones she would have made. They were the choices of a changed person, a new self. You could call this selfhood many things. Transformation. Metamorphosis. Falsity. Betrayal.

I call it an education."

Tara Westover, Educated

Dedicatoria

A mi familia, quienes han creído siempre en mí durante cada etapa y nunca han dudado de mis capacidades. En especial, a mi mamá Yesenia Ayala, la persona la cual le debo lo que soy y tiene mi más inmensa admiración. Gracias por todo el sacrificio y esfuerzo para que me encuentre cada día más cerca de lograr todos mis sueños. Eres mi inspiración constante y mi mayor apoyo para alcanzar mis metas.

A mi hermano, Juan Esteban Uribe, quien me ha permitido confiar más en mí a través de su profunda admiración y por alegrarme los días sin importar las diferencias, dificultades y las pocas horas de sueño.

A mis abuelos, Baudilio Ayala y Aura García, por su gran cariño y comprensión durante mi desarrollo personal y profesional. Gracias por estar siempre a mi lado acompañándome en cada etapa y alegrarse de cada uno de mis logros.

A mi tía, Mayra Ayala, por estar siempre presente, darme ánimos y apoyarme de forma incondicional. Gracias por impulsarme a crecer, a superar cada dificultad y a esforzarme por ser una mejor persona cada día. Tu amor y confianza han sido fundamentales para mí.

A mi pareja, Cristian Sandoval, quien ha sido el mejor compañero en esta etapa y me ha enseñado a ver la vida de una forma distinta. Gracias por brindarme ayuda incondicional sin dudarlo, celebrar tan fuerte mis logros y ser motivo de inmensa felicidad en cada uno de los momentos vividos.

A toda mi familia y amigos, quienes han estado siempre presente y me han acompañado para hacer posible este logro. Este trabajo es para todos ustedes con gran amor y dedicación.

Agradecimientos

Gracias totales a todos los que hicieron parte del desarrollo de este proyecto, no podría haberlo logrado sin su ayuda y apoyo. Especialmente:

A la Universidad Industrial de Santander y a la Escuela de Microbiología, por darme las oportunidades y herramientas para seguir desarrollándome a nivel profesional y personal.

Al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología por abrirme sus puertas y proporcionarme el espacio para llevar a cabo este proyecto. A mis compañeros de laboratorio, en especial a María Alejandra Ojeda y Yuliany Guillín. Gracias por estar a mi lado y no dudar en brindarme su ayuda y compañía. Más que nada me llevo su linda amistad durante todo este tiempo.

A mi codirectora, la doctora Diana Cortés, por recibirme en el Centro de Investigación de Biotecnología Aplicada en México y permitirme desarrollar nuevas habilidades durante la ejecución de mi trabajo. Al equipo de trabajo del laboratorio de Genética de Microorganismos Industriales, en especial a Marijose Jiménez, Emmanuel Juarez, Uriel Jiménez, Diego Hernández y Raquel Rodríguez, por todo lo que me brindaron durante mi estancia. Sin duda su amistad es lo más memorable que me llevo de esa experiencia.

A mis compañeros de la Maestría en Microbiología, Cristian Sandoval, Kewin Hernández, Angélica Ramírez y Carlos Bueno, por estar presentes más allá del entorno académico, hicieron de toda esta etapa una experiencia más divertida y enriquecedora. Gracias por ser un gran apoyo y celebrar a mi lado cada avance.

A mi director, el doctor German Zafra, por su compromiso, confianza y apoyo constante hacia mí y mi trabajo. Gracias por enseñarme con tanta dedicación y retarme para lograr más allá de lo propuesto. Su acompañamiento fue fundamental para mi crecimiento académico y personal y representó un papel muy significativo en el desarrollo y culminación de este trabajo.

Tabla de Contenido

Pág.

Introducción 14

1. Objetivos 17

1.1 Objetivo General 17

1.2 Objetivos Específicos 17

2. Marco conceptual y estado del arte 18

2.1. Hidrocarburos del petróleo 18

2.2. Contaminación del suelo por hidrocarburos 18

2.3. Biorremediación de suelos contaminados 19

2.4. Biodegradación de hidrocarburos utilizando consorcios microbianos 20

2.5. Escalado de procesos de biorremediación en biopilas 21

2.6. Evaluación de la toxicidad de suelos biorremediados 22

3. Metodología 24

3.1. Desarrollo del consorcio microbiano mixto degradador 24

3.1.1. Microorganismos degradadores de hidrocarburos 24

3.1.2. Selección y definición del consorcio microbiano mixto 25

3.2. Biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo mediano en biopilas 26

3.2.1. Caracterización fisicoquímica del suelo 26

3.2.2. Acondicionamiento y escalado del consorcio microbiano mixto 26

3.2.3. Ensayos de biorremediación en biopilas utilizando el consorcio microbiano mixto 27

3.2.4. Ensayos de biorremediación en microcosmos utilizando el consorcio microbiano mixto . 28

3.2.5. Seguimiento analítico de la biorremediación 30

3.2.6. Seguimiento de comunidades microbianas durante el proceso de biorremediación en biopilas 32

3.3. Evaluación ecotoxicológica de suelos tratados por biorremediación 33

3.3.1. Ensayos de toxicidad aguda 34

3.3.2. Ensayos de toxicidad crónica 35

3.4. Análisis estadístico 35

4. Resultados y discusión 36

4.1. Consorcio microbiano mixto degradador de petróleo crudo mediano 36

4.2. Ensayo de biodegradación de petróleo crudo mediano utilizando el consorcio microbiano mixto desarrollado 39

4.2.1. Eficiencia de degradación en biopilas a escala semipiloto 39

4.2.2. Análisis fisicoquímicos de los suelos biorremediados tras el proceso aplicado 44

4.2.3. Formación de intermediarios de degradación a partir del petróleo crudo mediano por parte del consorcio microbiano mixto 46

4.2.4. Estructura y diversidad de las comunidades microbianas durante el proceso de biorremediación en biopilas 51

4.2.4.1. Sucesión de las comunidades bacterianas durante el proceso de biorremediación. 51

4.2.4.2. Sucesión de las comunidades fúngicas durante el proceso de biorremediación. 55

4.3. Reducción de la toxicidad de los suelos biorremediados 59

4.3.1. Disminución de la toxicidad aguda en suelos. 60

4.3.2. Disminución de la toxicidad crónica en suelos 64

5. Conclusiones 67

6. Recomendaciones 69

Referencias Bibliográficas 71

Apéndices 89

Lista de Tablas

Pág.

Tabla 1 *Interacciones antagónicas entre cepas bacterianas y fúngicas en ensayos en placa*..... 37

Tabla 2 *Propiedades fisicoquímicas evaluadas de los suelos antes y después de los ensayos de biorremediación de 50 días en biopilas*..... 45

Tabla 3 *Abundancia de grupos funcionales detectados por GC-MS en suelos contaminados con petróleo y tratados por biorremediación en biopilas* 47

Tabla 4 *Clasificación de la toxicidad aguda en suelos biorremediados basada en la mortalidad del organismo bioindicador Daphnia magna después de 48 horas de exposición*. 63

Lista de Figuras

Pág.

Figura 1 *Degradación de petróleo crudo mediano en suelos contaminado con 15.000 mg por kg de suelo tras un ensayo de biorremediación en biopilas de 50 días*. 40

Figura 2 *Cambios en el perfil cromatográfico de la fracción volátil y semi-volátil de petróleo crudo mediano en el suelo durante 50 días de tratamiento con el consorcio microbiano mixto (Tratamiento T1)*.. 48

Figura 3 A*bundancia relativa de las comunidades bacterianas presentes en las muestras de suelo evaluadas en los ensayos de biorremediación en biopilas a nivel taxonómico de (A) familia y (B) género.* 53

Figura 4 *Índice de Shannon para diversidad alfa por (A) muestras individuales y (B) muestras agrupadas por días del ensayo de degradación para las comunidades bacterianas de los suelos evaluados en los ensayos de biorremediación.* 55

Figura 5 *Abundancia relativa de las comunidades fúngicas presentes en las muestras de suelo evaluadas en los ensayos de biorremediación en biopilas a nivel taxonómico de (A) familia y (B) género*. 57

Figura 6 *Índice de Shannon para diversidad alfa por (A) muestras individuales y (B) muestras agrupadas por días del ensayo de degradación para las comunidades fúngicas de los suelos evaluados en los ensayos de biorremediación.* 59

Figura 7 *Influencia de los tratamientos de biorremediación en la toxicidad aguda de suelos contaminados. Se muestran los efectos de los elutriados del suelo tras 120 h de exposición*..... 61

Figura 8 *Influencia de los tratamientos de biorremediación en la toxicidad crónica de suelos contaminados con petróleo crudo. Se muestran los efectos en plántulas de lechuga después de 14 días de exposición.*. 65

Lista de Apéndices

Pág.

Apéndice A. *Ensayo de degradación a escala de microcosmos a partir de un consorcio fúngico altamente tolerante*. 89

Apéndice B. *Medición de producción de CO_2 en los microcosmos durante el ensayo de degradación de 50 días*. 90

Apéndice C. *Producción de CO_2 del consorcio microbiano mixto en los microcosmos durante el ensayo de degradación de 50 días*. 91

Apéndice D. *Clasificación de compuestos detectados por GC-MS según complejidad a lo largo del proceso de biorremediación en cada uno de los tratamientos*. 92

Apéndice E. *Cambios en el perfil cromatográfico entre suelo no contaminado y tratamientos del ensayo de degradación de petróleo crudo mediano.* 94

Apéndice F. *Análisis de coocurrencia de comunidades bacterianas a nível de género*..... 95

Apéndice G. *Análisis de coocurrencia comunidades fúngicas a nível de género*. 96

Resumen

Título: Biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo mediano en biopilas utilizando un consorcio microbiano mixto a escala semipiloto*

Autor: Mábel Sofía Barrera Ayala**

Palabras Clave: biorremediación, consorcio microbiano, petróleo crudo mediano, biopilas, sucesiones microbianas, ecotoxicidad.

Descripción: La contaminación de suelos con petróleo crudo constituye una problemática ambiental a nivel global debido a las alteraciones que se generan en sus propiedades fisicoquímicas, la reducción de los ciclos biológicos y los efectos tóxicos sobre los organismos que se encuentran presentes. Debido a estas consecuencias, son necesarias estrategias sostenibles que permitan degradar los hidrocarburos y recuperar la funcionalidad del suelo. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia de degradación del petróleo crudo mediano y la reducción de la toxicidad en suelos luego de un proceso biorremediación en biopilas a escala semipiloto, utilizando un consorcio microbiano mixto. La evaluación de la eficiencia de degradación se realizó mediante técnicas analíticas, moleculares y ecotoxicológicas. En este estudio se desarrolló un consorcio microbiano mixto formado por *Paenibacillus cellulositrophicus*, *Stutzerimonas stutzeri*, *Rhodococcus qingshengii*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Aspergillus oryzae* y *Penicillium citrinum*, seleccionado por su tolerancia a hidrocarburos y ausencia de relaciones antagónicas. La aplicación del consorcio microbiano, combinado con la adición de salvado de trigo como bioestimulante logró la degradación del 84,64% del petróleo en 50 días. Este proceso permitió la disminución de alcanos de cadena larga e isoprenoides, aparición transitoria de ácidos grasos y ésteres, evidenciando la transformación progresiva de los hidrocarburos. El tratamiento favoreció una comunidad microbiana más diversa y funcional, con mayor abundancia relativa de géneros pertenecientes al consorcio como *Rhodococcus* y *Aspergillus*. Además, redujo significativamente la toxicidad aguda y crónica del suelo, mejorando la germinación y el crecimiento vegetal. Estos resultados demuestran que la bioaumentación y la bioestimulación constituyen una estrategia viable para recuperar de manera sostenible la funcionalidad biológica de los suelos contaminados con petróleo, con potencial para su implementación a una mayor escala.

---

*Trabajo de Grado

**Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Director: German Alexis Zafra Sierra. Doctor en Ciencias en Biotecnología. Codirector: Diana Verónica Cortés Espinosa. Doctora en ciencias en la especialidad en Biotecnología.

Abstract

Title: Bioremediation of soils contaminated with medium crude oil in biopiles using a mixed microbial consortium at semi-pilot scale*

Author: Mábel Sofía Barrera Ayala**

Key Words: bioremediation, microbial consortium, medium crude oil, biopiles, microbial successions, ecotoxicity.

Description: Soil contamination with crude oil is a global environmental problem due to the alterations it causes in the soil's physicochemical properties, the disruption of biological cycles, and the toxic effects on the organisms present in the soil. Because of these consequences, sustainable strategies are needed to degrade hydrocarbons and restore soil functionality. Therefore, the objective of this study was to evaluate the efficiency of medium-grade crude oil degradation and the reduction of soil toxicity following a bioremediation process in biopiles at semi-pilot scale, using a mixed microbial consortium. The evaluation of degradation efficiency was conducted using analytical, molecular, and ecotoxicological techniques. In this study, a mixed microbial consortium was developed consisting of *Paenibacillus cellulositrophicus, Stutzerimonas stutzeri, Rhodococcus qingshengii, Cellulosimicrobium cellulans, Aspergillus oryzae*, and *Penicillium citrinum*, selected for their tolerance to hydrocarbons and the absence of antagonistic relationships. The application of the microbial consortium, combined with the addition of wheat bran as a biostimulant, achieved the degradation of 84.64% of the oil within 50 days. This process led to a reduction in long-chain alkanes and isoprenoids, as well as a transient increase in fatty acids and esters, indicating the progressive transformation of the hydrocarbons. The treatment promoted a more diverse and functional microbial community, with a higher relative abundance of genera belonging to the consortium, such as *Rhodococcus* and *Aspergillus*. Furthermore, it significantly reduced acute and chronic soil toxicity, improving seed germination and plant growth. These results demonstrate that bioaugmentation and biostimulation constitute a viable strategy for sustainably restoring the biological functionality of oil-contaminated soils, with potential for implementation on a larger scale.

---

*Degree Work

**Faculty of Health. School of Microbiology. Director: German Alexis Zafra Sierra. PhD in Sciences in Biotechnology. Co-director: Diana Verónica Cortés Espinosa. PhD in Science specializing in Biotechnology.

Introducción

Las actividades industriales relacionadas con el desarrollo económico de los países, especialmente aquellas relacionadas con el petróleo, producen un impacto negativo sobre los ecosistemas y particularmente sobre los suelos. Las actividades humanas, incluidas la exploración, el transporte y el refinamiento de petróleo y gas, así como la gestión inadecuada de los desechos peligrosos, incrementan el número de lugares contaminados en el mundo cada día (Daâssi y Qabil Almaghribi, 2022). En Colombia, esta problemática adquiere especial relevancia por la presencia de zonas históricamente impactadas por actividades petroleras, donde la contaminación de los suelos es de gran importancia debido a la toxicidad y persistencia de los hidrocarburos a largo plazo, los cuales pueden generar efectos negativos en la fertilidad, en la flora y fauna circundante, y potencialmente sobre la salud humana. Tan solo en el periodo entre enero y diciembre del 2025, se han registrado en Colombia 176 incidentes relacionados con derrames de hidrocarburos, con un volumen total derramado de 35,8 barriles, causando un impacto significativo en el medio ambiente (Ecopetrol S.A., 2025).

El petróleo es un sustrato de difícil biodegradación, compuesto por distintas fracciones que incrementan progresivamente su complejidad. Los hidrocarburos presentes en el petróleo corresponden a una mezcla compleja de fracciones alifáticas, aromáticas, resinas y asfaltenos, los cuales generan residuos tóxicos que requieren tratamientos específicos. Estas fracciones presentan distintos grados de complejidad, siendo las resinas y los asfaltenos las más recalcitrantes por su elevado peso molecular y baja biodisponibilidad (Kulkarni et al., 2024). Entre los efectos adversos generados por las fracciones más pesadas del petróleo, están la producción de compuestos tóxicos que son absorbidos por las plantas, el deterioro de la estructura del suelo, pérdida de materia orgánica y nutrientes, así como la disminución de la producción y productividad de esta matriz.

Para realizar la remediación de suelos contaminados se han empleado métodos físicoquímicos, sin embargo, presentan efectos negativos, siendo costosos, invasivos y poco sostenibles. Debido a estas limitaciones, la biorremediación ha emergido como una alternativa más ecológica y sostenible, utilizando microorganismos capaces de degradar los compuestos tóxicos presentes en el petróleo (Gao et al., 2022).

La degradación de los hidrocarburos del petróleo, en especial de sus fracciones más pesadas, es producto de un efecto sinérgico entre distintos organismos. Por ello, la utilización de consorcios microbianos permite ventajas efectivas como lo es mayor estabilidad ante cambios ambientales, la capacidad de llevar a cabo procesos metabólicos más complejos y realizar cometabolismo, generando compuestos menos tóxicos que los originales o llegar incluso al grado de mineralización. Estas interacciones microbianas pueden favorecer la degradación de las fracciones del petróleo, incluso de las más pesadas y recalcitrantes mediante la acción de enzimas oxidativas, monooxigenasas, reductasas, transferasas y otras enzimas asociadas con la transformación de estos compuestos (Silva Monteiro et al., 2024). Por ello, los consorcios bacterianos y fúngicos a partir de microorganismos aislados de ambientes contaminados constituyen candidatos relevantes para procesos de biorremediación, especialmente cuando han demostrado potencial de tolerancia y capacidad degradadora frente a hidrocarburos pesados (L. Wu et al., 2025).

La eficiencia de biodegradación del petróleo crudo en suelos no depende únicamente de la capacidad de degradación de los microorganismos presentes como consorcios microbianos, sino de múltiples factores bióticos y abióticos, entre ellos la disponibilidad del contaminante, la composición del suelo, la presencia de nutrientes, la humedad, el pH, la aireación, la temperatura y la capacidad funcional de las comunidades microbianas involucradas. Estas condiciones pueden

ser difíciles de garantizar y controlar cuando los procesos se realizan a una mayor escala. Por ello, existe la necesidad de evaluar la capacidad de los consorcios microbianos bajo condiciones más cercanas a la aplicación real, considerando no solo la capacidad de reducción del contaminante, sino el efecto sobre la disminución de la toxicidad y recuperación integral de la matriz (Antón-Herrero et al., 2023). Frente a estos desafíos, la biorremediación en biopilas, una tecnología *ex situ*, se propone como una alternativa prometedora, ya que permite un control riguroso de las condiciones ambientales, optimizando así el proceso de biodegradación (P. F. Liu et al., 2021). Además, el uso de consorcios microbianos mejora la eficiencia del proceso, ya que estos consorcios pueden abordar la diversidad química del petróleo crudo, permitiendo la degradación simultánea de distintos compuestos y una reducción significativa de la toxicidad en el suelo (Zhang y Zhang, 2022).

Aunque estudios de laboratorio han demostrado la elevada tolerancia y eficiencia de distintos consorcios para la biodegradación de hidrocarburos en suelos, es necesario evaluar y conocer su capacidad para restaurar su funcionalidad ecológica. La búsqueda de este conocimiento es fundamental, especialmente al considerar la aplicación de estos consorcios a mayor escala, a través del uso de biopilas (P. F. Liu et al., 2021). Por lo tanto, es necesario implementar nuevas estrategias que no solo se enfoquen en la degradación del crudo, sino también en la reducción de la toxicidad y la evaluación de las comunidades microbianas involucradas, con el fin de lograr una remediación y recuperación del suelo completa y sostenible (Zawierucha et al., 2022). Debido a lo anterior, se plantea la pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto de la aplicación de un consorcio microbiano mixto en la eficiencia de degradación y reducción de la toxicidad de suelos contaminados con petróleo crudo a través de un proceso de biorremediación en biopilas a escala semipiloto?

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar la eficiencia de degradación y reducción de la toxicidad en suelos contaminados con petróleo crudo mediano a través de biorremediación en biopilas utilizando un consorcio microbiano mixto.

1.2 Objetivos Específicos

Desarrollar un consorcio microbiano mixto degradador de petróleo crudo mediano para su aplicación en procesos de biorremediación de suelo contaminado.

Evaluar la eficiencia del proceso de biorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo mediano en biopilas a escala semipiloto, a través de métodos analíticos y moleculares.

Determinar el efecto del tratamiento de biorremediación sobre la reducción de la toxicidad de los suelos.

2. Marco conceptual y estado del arte

2.1. Hidrocarburos del petróleo

El petróleo es una mezcla compleja de compuestos que abarcan diversas estructuras, incluyendo alcanos, aromáticos, resinas y asfaltenos, así como trazas de compuestos que contienen oxígeno, azufre y nitrógeno en su estructura molecular (Nzila y Musa, 2021). Los componentes del petróleo exhiben un aumento en su complejidad, siendo los alcanos los más livianos, seguidos por los aromáticos, y finalmente, las resinas y los asfaltenos. Estos últimos constituyen las fracciones más pesadas y resistentes del crudo debido a su elevado peso molecular y su contenido de metales pesados. Los componentes individuales del petróleo comprenden un amplio intervalo de pesos moleculares, desde moléculas pequeñas como el metano, con un peso molecular de 16 g/mol, hasta sus fracciones más complejas como lo son las resinas y los asfaltenos, las cuales pueden presentar valores de hasta 1.000 g/mol. Sin embargo, el petróleo no posee un peso molecular único, sino que depende de su origen, grado de madurez y composición (Arghiropol et al., 2025).

2.2. Contaminación del suelo por hidrocarburos

El petróleo es ampliamente reconocido como uno de los contaminantes que afectan más el entorno ambiental. Sus derrames y procesos de manipulación ocasionan un daño significativo en los ecosistemas, especialmente en el suelo, debido a su extensa superficie de adsorción, que acumula grandes cantidades de este contaminante (Stepanova et al., 2022). Los hidrocarburos presentes en el petróleo afectan de manera adversa la composición física, química, estructural y las propiedades del suelo, incluyendo el pH, el contenido de agua, la concentración de materia orgánica y la porosidad. Mientras que las fracciones más ligeras son rápidamente degradadas por

microorganismos, las fracciones más pesadas, como las resinas y los asfaltenos, se acumulan y quedan atrapadas en los poros, convirtiéndose en una fracción residual que prácticamente se mantiene como un contaminante permanente. Estas alteraciones tienen consecuencias negativas, como la disminución de la fertilidad del suelo, la reducción de la actividad biológica y la contaminación de otras matrices del entorno ambiental (Z. Liu et al., 2025).

2.3. Biorremediación de suelos contaminados

La biorremediación hace referencia al proceso mediante el cual se aprovechan sistemas biológicos para la eliminación o reducción de contaminantes ambientales. Este enfoque presenta atractivos significativos, tales como el tratamiento de los contaminantes con mínima alteración de la matriz afectada y la capacidad de los microorganismos para mineralizar los contaminantes orgánicos en fracciones inorgánicas más simples y menos tóxicos como biomasa microbiana, CO_2, agua y compuestos inorgánicos (Elshafei y Mansour, 2024). En el caso de los derrames de petróleo, la presencia de microorganismos con capacidades metabólicas adecuadas es crucial para la biorremediación. Los microorganismos que habitan los ecosistemas contaminados han demostrado poseer capacidad para llevar a cabo este proceso, especialmente aquellos expuestos al contaminante durante períodos prolongados (Mekonnen et al., 2024). Dado que el petróleo crudo contiene una variedad de compuestos, la eficiencia de la biodegradación depende de variables tales como la concentración y disponibilidad del contaminante, la tasa de transferencia y adsorción del hidrocarburo, el potencial redox, la presencia de nutrientes, el potencial hídrico, el pH y la temperatura de la matriz. Estas variables y factores soportan las funciones biológicas involucradas en el proceso (Daâssi y Qabil Almaghribi, 2022).

2.4. Biodegradación de hidrocarburos utilizando consorcios microbianos

El uso de métodos biológicos para la degradación de hidrocarburos pesados presenta una serie de ventajas en comparación con otras técnicas. Específicamente, estos métodos se caracterizan por su alta especificidad, rentabilidad y sostenibilidad ambiental (Kuppan et al., 2024). Se han identificado microorganismos con la capacidad de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono para soportar su crecimiento. Estos microorganismos poseen enzimas especializadas que les permiten realizar la ruptura de los anillos aromáticos de las estructuras, así como también la fragmentación de enlaces con otros compuestos orgánicos e inorgánicos (Zargar et al., 2021). Se ha observado que los microorganismos más efectivos en esta degradación son aquellos que han estado en contacto con las fracciones pesadas después de la contaminación. Por lo tanto, se ha optado por utilizar consorcios microbianos aislados a partir de las áreas contaminadas, ya que presentan la capacidad de oxidar y mineralizar eficientemente estos contaminantes (Lázaro-Mass et al., 2023). El uso de consorcios mejora la biorremediación, debido a que es una estrategia que integra las capacidades metabólicas que pueden ser complementarias entre los organismos. Entre las ventajas que representan los consorcios microbianos se encuentran, favorecer el cometabolismo, aportar estabilidad funcional a cambios ambientales, incrementar la producción de metabolitos que promuevan el proceso de biodegradación y mejorar la capacidad de realizar tareas más complejas que requieren múltiples pasos (Rezaei y Moghimi, 2024).

Estudios han demostrado que el desarrollo de un consorcio microbiano ha logrado aumentar la degradación de hidrocarburos del petróleo hasta un 63%, con una reducción del 80% en los compuestos aromáticos (B. Wu et al., 2023). Otro estudio demostró que un consorcio fúngico logró metabolizar hasta un 78,1% del petróleo pesado, reducir la tensión superficial y exhibir actividades de emulsificación e hidrofobicidad destacadas, además de generar una mayor

actividad enzimática, subrayando su potencial para la biorremediación y aplicaciones industriales en la eliminación de contaminación por petróleo (Yehia, 2023). Estudios recientes también han optimizado consorcios microbianos mediante biología sintética para modular rutas metabólicas y lograr una degradación del 65% de hidrocarburos de cadena larga, lo cual promete aplicaciones más eficientes en campo (Yessentayeva et al., 2024). Asimismo, otro estudio determinó que la adición de promotores enzimáticos en consorcios microbianos aumenta la actividad de degradación en suelos contaminados, logrando una disminución del 78% de hidrocarburos pesados en 60 días, destacando el potencial de estos métodos para tratamientos rápidos y sostenibles en biorremediación (Dai et al., 2021). Se sabe que la transformación microbiana de los hidrocarburos de alto peso molecular involucra enzimas oxidativas extracelulares, enzimas P450 monooxigenasas, transferasas, nitroreductasas, reductasas de quinona y dehalogenasas reductivas, que participan en la degradación y remoción de contaminantes orgánicos. Estas enzimas confieren a los microorganismos una gran versatilidad la biorremediación de compuestos recalcitrantes (Tesfaye et al., 2025).

2.5. Escalado de procesos de biorremediación en biopilas

Los ensayos de biorremediación utilizando biopilas son métodos ampliamente utilizados para el tratamiento de suelos contaminados por hidrocarburos, debido a su eficiencia en la reducción de contaminantes en suelo en un ambiente controlado (Gallego et al., 2022). Las biopilas consisten en pilas de suelo contaminado acondicionadas con condiciones óptimas de humedad, temperatura, y nutrientes, promueven el crecimiento de microorganismos que degradan los hidrocarburos presentes (Ostovar et al., 2025). En estudios recientes, las biopilas han demostrado una alta efectividad en la eliminación de hidrocarburos de petróleo, con resultados que alcanzan

hasta un 93% de remoción en periodos de meses. Este método *ex situ* también facilita el control y monitoreo de los parámetros, permitiendo optimizar el proceso al ajustar factores como el oxígeno y los nutrientes esenciales, lo cual aumenta la biodegradación microbiana y mejora la eficiencia del proceso (Bala et al., 2022). Además, este método requiere una inversión inicial relativamente baja y resulta escalable, haciéndolo adecuado para su aplicación en áreas extensas de suelo contaminado, con costos de operación bajos en comparación con métodos fisicoquímicos (Mekonnen et al., 2024).

2.6. Evaluación de la toxicidad de suelos biorremediados

La evaluación de la toxicidad en suelos biorremediados es fundamental para determinar la eficacia y seguridad ambiental de los procesos aplicados. Estas pruebas pueden catalogarse en pruebas agudas y crónicas, las cuales permiten evaluar no solo la disminución de la concentración del contaminante sino el efecto de contaminantes residuales, intermediarios de la degradación y compuestos biodisponibles que podrían permanecer luego del tratamiento (M. Wu et al., 2024). Estudios de toxicidad aguda incluyen especies vegetales como *Avena sativa*, *Lepidium sativum, Triticum aestivum* y *Lactuca sativa* para evaluar la germinación y el crecimiento radicular, parámetros clave en la detección de toxicidad residual en suelos tratados con biorremediación (Dhar et al., 2022; Jayaramaiah et al., 2022; Steliga et al., 2020). Otro bioindicador ampliamente utilizado para evaluar toxicidad aguda corresponde al cladócero *Daphnia magna*, donde se evalúa su inmovilización y mortalidad al ser expuesto a extractos acuosos de los suelos biorremediados (Choi et al., 2022). Estudios que evalúan toxicidad crónica presentan pruebas con semillas de *Sinapis alba*, *Lepidium sativum* y *Sorghum saccharatum* donde se evalúa condiciones fisiológicas del crecimiento vegetal como la emergencia, biomasa, longitud de las raíz y signos y síntomas de

fitotoxicidad (Wang et al., 2025). Estas pruebas ecotoxicológicas son fundamentales para evaluar el impacto residual de los procesos de biorremediación y asegurar que los suelos restaurados sean seguros para fines agrícolas y ecológicos.

2.7. Antecedentes directos, limitaciones actuales y perspectivas

El Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) de la Universidad Industrial de Santander ha desarrollado consorcios bacterianos y fúngicos con capacidad para degradar fracciones recalcitrantes del petróleo. Navas-Cáceres et al. (2023) desarrollaron un consorcio compuesto por cinco cepas bacterianas tolerantes a elevadas concentraciones de asfaltenos, que alcanzó una degradación del 83% en suelos contaminados con 10.000 mg de asfaltenos por kg de suelo después de 52 días. Por otra parte, Barrera et al. (2026) evaluaron un consorcio fúngico integrado por tres cepas de hongos filamentosos, obteniendo una degradación del 55,6 % de asfaltenos en 30 días, además de identificar respuestas transcripcionales asociadas con enzimas oxidativas involucradas en la transformación de hidrocarburos. Estos antecedentes evidencian el potencial de los microorganismos seleccionados y constituyen una base para el desarrollo de nuevas estrategias de biorremediación.

A pesar de estos avances, los consorcios desarrollados previamente han sido evaluados de forma individual en microcosmos a escala de laboratorio, por lo cual su desempeño a una mayor escala requiere de investigación. Además de esto, hasta la fecha aún existen desafíos relacionados con la compatibilidad y estabilidad de los consorcios mixtos, su interacción con la microbiota nativa del suelo y el mantenimiento de la eficiencia de degradación al aumental la escala del proceso, debido a los cambios en las condiciones ambientales, la disponibilidad de nutrientes y la biodisponibilidad del contaminante (Mekonnen et al., 2024; Rezaei y Moghimi, 2024). Asimismo,

aunque se han reportado elevados porcentajes de remoción de hidrocarburos, estos resultados no necesariamente reflejan una transformación completa del contaminante ni una disminución proporcional de la toxicidad residual, debido a la posible persistencia de fracciones recalcitrantes y la formación de intermediarios de degradación con efectos adversos sobre los organismos (M. Wu et al., 2024). A su vez, resulta necesario relacional la transformación química del petróleo, los cambios en las comunidades microbianas y las respuestas ecotoxicológicas del suelo, debido a que estos parámetros permiten evaluar diferentes aspectos de la efectividad de los procesos de biorremediación (Zawierucha et al., 2022). Por tanto, el desarrollo y la evaluación de consorcios mixtos en biopilas a escala semipiloto requieren estrategias integrales que combinen la selección de microorganismos compatibles, la optimización de las condiciones de bioaumentación y bioestimulación, el seguimiento de las comunidades microbianas y la evaluación conjunta de la remoción de hidrocarburos, sus transformaciones químicas y la toxicidad residual. Esta aproximación permitiría generar evidencia más completa sobre el desempeño de estas estrategias y sus posibilidades de aplicación a mayor escala.

3. Metodología

3.1. Desarrollo del consorcio microbiano mixto degradador

3.1.1. *Microorganismos degradadores de hidrocarburos*

Para el desarrollo del consorcio microbiano mixto se utilizaron cinco cepas bacterianas (*Paenibacillus cellulositrophicus* 21S, *Rhodococcus corynebacterioides* 18S, *Stutzerimonas stutzeri* PH5, *Rhodococcus qingshengii* PH3D y *Cellulosimicrobium cellulans* AB3) (Navas-Cáceres et al., 2023) y tres cepas fúngicas (*Aspergillus sydowii* H1, *Aspergillus oryzae* H3 y

Penicillium citrinum H10), depositadas en la colección biológica LMMA de la Universidad Industrial de Santander.

3.1.2. *Selección y definición del consorcio microbiano mixto*

La selección de los microorganismos pertenecientes al consorcio microbiano mixto se basó en tres criterios: 1) la capacidad de crecimiento de los aislados utilizando petróleo crudo pesado como única fuente de carbono; 2) la tolerancia a elevadas concentraciones de hidrocarburos pesados; y 3) la ausencia de relaciones antagónicas entre sí. Las primeras dos características habían sido evaluadas previamente en estudios anteriores (Barrera et al., 2026; Navas-Cáceres et al., 2023). La evaluación *in vitro* del antagonismo entre los microorganismos se realizó a través de ensayos en placa en medio M9 (composición por litro: Na_2HPO_4, 12,8 g; KH_2PO_4, 3 g; NH_4Cl, 1 g; $CaCl_2.2H_2O$, 0,015 g; $FeSO_4.6H_2O$, 0,01 g; NaCl, 0,5 g; y $MgSO_4.7H_2O$, 1 g), tanto suplementado con 0,1% de petróleo crudo y en medio sin suplementar. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min. Posteriormente, se adicionó asépticamente petróleo crudo (0,1 % p/v), sin someterlo a un procedimiento de esterilización independiente. El antagonismo entre las cepas fúngicas se realizó a partir de la siembra de 10^4 esporas de cada cepa a 4 cm de distancia en la misma caja de Petri, e incubadas a 30°C durante 10 días para la posterior evaluación de las interacciones antagónicas. Una vez determinado el antagonismo entre las cepas fúngicas, se realizaron pruebas adicionales para evaluar la degradación frente a hidrocarburos pesados (Apéndice A). El antagonismo de hongos hacia bacterias se evaluó a través de una siembra central de 10^4 esporas de cada cepa fúngica y su posterior incubación a 30°C. Una vez observada la esporulación, se inocularon 10^4 UFC de cada cepa bacteriana de forma radial hasta observar su crecimiento o inhibición. El antagonismo de bacterias hacia hongos se evaluó a través de la inoculación de 10^4 esporas de las cepas fúngicas de forma central y 10^4 UFC de las cepas

bacterianas de forma radial al mismo tiempo y su incubación a 30°C (Zafra et al., 2017). Se seleccionaron las cepas que no presentaran ausencia de crecimiento o halos de inhibición.

3.2. Biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo mediano en biopilas

3.2.1. *Caracterización fisicoquímica del suelo*

El suelo utilizado para los ensayos de biodegradación se caracterizó fisicoquímicamente al inicio y final del proceso de biorremediación en biopilas. Las muestras de suelo se remitieron al Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander para evaluar los parámetros de: nitrógeno total (NT), carbono orgánico total (COT), fósforo total (PT), pH y textura. El nitrógeno total (NT) se determinó mediante el método Kjeldahl, seguido de cuantificación espectrofotométrica. El contenido de carbono orgánico total (COT) se determinó mediante el método Walkley-Black, utilizando una solución de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en ácido sulfúrico concentrado. El fósforo disponible (FD) se determinó mediante espectrofotometría utilizando el método de molibdovanadato, de acuerdo con la NTC 234:1996. El pH se determinó según el procedimiento operativo estándar descrito por la FAO. La textura se determinó mediante el método de la pipeta de Bouyoucos adaptado (Gómez Giraldo, 2013).

3.2.2. *Acondicionamiento y escalado del consorcio microbiano mixto*

La biomasa fúngica se escaló mediante fermentación en estado sólido utilizando el salvado de trigo como soporte de crecimiento, el cual se inoculó con una concentración de $9{,}33x10^7$ esporas por gramo de cada una de las cepas fúngicas seleccionadas, determinada mediante recuento directo en cámara de Neubauer. Las cepas se incubaron bajo condiciones de 30% de humedad relativa, a 30 °C durante 7 días. Las cepas bacterianas se cultivaron individualmente en fermentación sumergida en reactores de 1 L, en caldo BHI suplementado con 0,1% de petróleo crudo mediano

durante 48 horas. El crecimiento bacteriano se monitoreó mediante mediciones de absorbancia (600 nm) y las suspensiones se ajustaron a una concentración celular estimada de $1x10^8$ células/mL. Posteriormente las suspensiones bacterianas se añadieron al residuo agroindustrial en proporciones de $9,33x10^7$ de cada una. El residuo agroindustrial con el consorcio inmovilizado se almacenó hasta su aplicación en los ensayos de biorremediación de suelos contaminados (Montaño Moreno, 2015).

3.2.3. *Ensayos de biorremediación en biopilas utilizando el consorcio microbiano mixto*

La capacidad del consorcio microbiano mixto para degradar el petróleo y reducir la toxicidad de los suelos contaminados fue evaluada a través de ensayos de biorremediación en biopilas con una masa húmeda final de 5 kg, utilizando una combinación de bioaumentación (inoculación del consorcio microbiano) y bioestimulación (adición de salvado de trigo como estimulante de la microbiota nativa y texturizador del suelo). Para la realización de los ensayos se utilizó un suelo disponible comercialmente (ANASAC, Colombia) contaminado con 15.000 mg de petróleo crudo mediano (gravedad API 26.2) por kg de suelo, con relación suelo:residuo correspondiente a 95:5 y se ajustó la humedad al 30% utilizando agua destilada. Los tratamientos de biodegradación se establecieron de la siguiente manera:

- T1 (bioaumentación + bioestimulación): Consistió en biopilas que contenían 3,325 kg de suelo contaminado, 0,175 kg de salvado de trigo estéril e inoculados con $5,6x10^8$ células bacterianas y esporas fúngicas/g de suelo del consorcio microbiano mixto. Este tratamiento fue diseñado para evaluar la capacidad del consorcio microbiano y la microbiota nativa del suelo para degradar petróleo crudo.
- T2 (bioestimulación): Consistió en biopilas que contenían 3,325 kg de suelo contaminado, 0,175 kg de salvado de trigo estéril y no inoculado con el consorcio microbiano mixto. Este

tratamiento se utilizó para evaluar la capacidad de la microbiota nativa para degradar el petróleo crudo mediano en ausencia del consorcio microbiano.

- T3 (atenuación natural): Consistió en biopilas que solo contenían 5 kg de suelo contaminado, sin inocular el consorcio microbiano y sin adición de un residuo estimulante. Este tratamiento se utilizó para conocer el porcentaje de degradación del petróleo sin ningún tipo de intervención.
- Control de crecimiento: Consistió en biopilas de 3,325 kg de suelo no contaminado, 0,175 kg de salvado de trigo estéril, e inoculados con $5{,}6x10^8$ células bacterianas y esporas fúngicas/g de suelo del consorcio microbiano mixto. Este control fue incluido para evaluar la dinámica de las poblaciones (la microbiota nativa y el consorcio microbiano inoculado) en ausencia de contaminación por hidrocarburos.

Todos los ensayos se desarrollaron durante 50 días a una temperatura aproximada de 25 °C bajo condiciones ambientales. Las biopilas permanecieron cubiertas con un tejido poroso durante el periodo experimental y se airearon por volteo manual cada 24 h para mantener las condiciones aeróbicas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, utilizando dos biopilas independientes por tratamiento (n=2), consideradas réplicas biológicas.

3.2.4. *Ensayos de biorremediación en microcosmos utilizando el consorcio microbiano mixto*

Para cuantificar la producción de intermediarios de degradación del petróleo crudo, así como estimar la producción de CO_2 por parte del consorcio microbiano se realizaron ensayos de biorremediación bajo condiciones controladas en reactores a escala microcosmos replicando las condiciones utilizadas en los ensayos en biopilas. Los sistemas se prepararon en reactores de vidrio de 100 ml sellados herméticamente, con una masa húmeda final de 10 g, y ajustando la humedad relativa a 30% utilizando medio líquido Czapek (composición por litro: $NaNO_3$, 3 g; K_2HPO_4, 1

g; $MgSO_4$, 0.5 g; KCl 0.5 g; $FeSO_4$, 0.01 g; sacarosa 30 g), utilizando el mismo suelo, petróleo crudo, y texturizante de los ensayos en biopilas. Los tratamientos fueron los siguientes:

- T1M (bioaumentación + bioestimulación): Consistió en reactores con 6,65 g de suelo estéril contaminado, 0,35 g de salvado de trigo estéril, e inoculados con $5{,}6x10^8$ células bacterianas y esporas fúngicas/g de suelo del consorcio microbiano mixto. Este tratamiento fue diseñado para evaluar únicamente la capacidad del consorcio microbiano.
- T2M (bioestimulación): Consistió en reactores con 6,65 g de suelo contaminado no estéril y 0,35 g de salvado de trigo estéril, sin inocular el consorcio microbiano. Este tratamiento se utilizó para evaluar la capacidad de la microbiota nativa del suelo para degradar el petróleo crudo mediano en ausencia del consorcio microbiano.
- Control de degradación abiótica: Consistió en reactores con 6,65 g de suelo estéril contaminado, 0,35 g de salvado de trigo estéril, sin inocular el consorcio microbiano. Este tratamiento se utilizó para descartar las pérdidas no biológicas de hidrocarburos como lo puede ser la volatilización.
- Control de crecimiento: Consistió en reactores con 6,65 g de suelo no contaminado, 0,35 g de salvado de trigo estéril e inoculados con $5{,}6x10^8$ células bacterianas y esporas fúngicas/g de suelo del consorcio microbiano mixto. Este control fue diseñado para conocer la capacidad de crecimiento en condiciones no adversas.

Todos los ensayos se llevaron a cabo durante 50 días, a una temperatura aproximada de 25 °C, y se airearon cada 48 h para mantener condiciones aeróbicas y se realizó la cuantificación de CO_2 producida a lo largo del tiempo (Apéndice B). Los ensayos se realizaron por duplicado, utilizando dos microcosmos independientes por tratamiento (n=2), donde cada reactor constituyó una unidad experimental independiente.

3.2.5. *Seguimiento analítico de la biorremediación*

La degradación de petróleo crudo mediano en el suelo se cuantificó al día 50 del ensayo de degradación en biopilas utilizando el método de agitación-centrifugación, el cual se basa en la recuperación de la fracción orgánica extraíble del suelo mediante solvente y la cuantificación gravimétrica del residuo recuperado (Fernández-Linares et al., 2006). Se tomaron 2 g de suelo húmedo por muestra, se añadió 1 g de Na_2SO_4 anhidro y luego se adicionaron 15 mL de un solvente extractor compuesto de tolueno y diclorometano en una proporción de 2:1 (v/v). Las muestras se agitaron vigorosamente en vórtex durante 1 min y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min. Los extractos orgánicos se recuperaron y evaporaron para determinar la concentración de petróleo residuales extraíble en el suelo mediante gravimetría, según el método estándar ASTM D6560 (ASTM International, 2022), mediante la siguiente ecuación: $HC = [(R_B - R_A) \times F_C]/(P \times F_H)$, donde R_A es la masa del recipiente vacío (mg), R_B es la masa del recipiente con el extracto concentrado (mg); P es la masa de suelo húmedo extraído (mg), F_H es el factor de corrección por humedad (1 – (%humedad/100)), y F_C es el factor de conversión a kg de suelo seco (1000). Las muestras control correspondientes al tiempo cero se sometieron al mismo procedimiento de extracción para determinar la concentración inicial de hidrocarburos recuperables (C_0). El porcentaje de remoción de hidrocarburos se calculó mediante la ecuación: $[(C0 - Ct)/C0] \times 100$ donde Ct corresponde a la concentración de hidrocarburos recuperables en el tiempo de evaluación correspondiente. Los ensayos de extracción se realizaron por duplicado.

Para la determinación de los intermediarios de degradación producidos durante la biorremediación, se tomaron muestras de los diferentes tratamientos a lo largo de los 50 días de los ensayos de degradación en microcosmos. Se realizó mediante un esquema de muestreo destructivo, utilizando dos microcosmos independientes por tratamiento y tiempo de evaluación (n=2). Las muestras se obtuvieron mediante el sacrificio de los reactores correspondientes a cada

tiempo de muestreo, evitando reutilizar una misma unidad experimental en evaluaciones posteriores. Se recolectaron muestras del suelo contaminado y el no contaminado antes de la aplicación de los tratamientos (día cero) para conocer las condiciones iniciales de los suelos. En el tratamiento T1M (bioestimulación y bioaumentación), se tomaron muestras los días 10, 20, 30, 40 y 50 del ensayo con la finalidad de conocer los compuestos generados únicamente por el consorcio microbiano a lo largo del proceso de degradación. En los tratamientos T2M (bioestimulación), control de degradación abiótica y el control de crecimiento del consorcio en el suelo, se tomó una muestra únicamente al día 50. A partir de las muestras del suelo, se obtuvo el extracto del hidrocarburo remanente en los suelos utilizando el método de agitación-centrifugación (ASTM, 2022), con un solvente extractor compuesto de tolueno y diclorometano en una proporción de 2:1. Los extractos orgánicos se evaporaron y se concentraron para su análisis en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas de la Universidad Industrial de Santander. La caracterización de los compuestos presentes en los extractos orgánicos se realizó mediante inyección directa por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), en modo de barrido completo (*full scan*). Se utilizó una columna capilar ZB-5MS (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), helio como gas de arrastre (1,0 mL/min) y un inyector a 250 °C en modo *split* (5:1). El horno inició a 45 °C durante 5 min, seguido de rampas de 4 °C/min hasta 150 °C, 5 °C/min hasta 250 °C y 10 °C/min hasta 300 °C, con tiempos de permanencia de 2, 5 y 70 min, respectivamente. La espectrometría de masas se realizó mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV, en un intervalo de *m/z* de 32–400. La identificación presuntiva de los compuestos con abundancias relativas superiores al 0,1 % se efectuó mediante comparación de sus espectros con las bibliotecas Adams, Wiley y NIST.

3.2.6. *Seguimiento de comunidades microbianas durante el proceso de biorremediación en biopilas*

Se realizaron extracciones de ADN genómico a partir de muestras de suelo de cada tratamiento en biopilas (T1, T2, T3 y control de crecimiento) al día inicial, día 25 y día 50. Para cada tratamiento se establecieron dos biopilas independientes (réplicas biológicas), de las cuales se recolectaron muestras compuestas de suelo. Las muestras procedentes de ambas réplicas se homogenizaron para obtener una única muestra representativa por tratamiento y tiempo de evaluación, a partir de la cual se realizó la extracción de ADN genómico utilizando el kit comercial DNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN). En el día 0 se analizaron dos muestras correspondientes al suelo contaminado y al suelo no contaminado, y en los días 25 y 50 se analizaron cuatro muestras por tiempo, correspondientes a cada uno de los tratamientos experimentales, obteniendo un total de 10 muestras pata el seguimiento molecular mediante la secuenciación masiva de códigos de barras de ADN (*metabarcoding*). Para ello, se realizó la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S bacteriano mediante PCR de punto final utilizando los primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') para el análisis de comunidades bacterianas (Vanhee et al., 2024), así como las regiones del espaciador transcrito interno (ITS) (ITS1 e ITS2) y del gen del ARN ribosomal 5.8S se realizó con los cebadores ITS5 (5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′) e ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) para el análisis de comunidades fúngicas (White et al., 1990). Las librerías de ADN se prepararon mediante el Rapid Barcoding Kit 96 SQK-RBK114.96 (Oxford Nanopore). La secuenciación monitorizada en tiempo real se llevó a cabo utilizando un minisecuenciador MinION Mk1B equipado con una celda de flujo FLOMIN114 (R.10.4.1).

El flujo bioinformático de las lecturas obtenidas se realizó en un entorno Linux (Ubuntu), el cual consistió en la realización del *basecalling*, la demultiplexación, el control de calidad, la

eliminación de secuencias quiméricas y la clasificación taxonómica. Inicialmente, el *basecalling* y la demultiplexación se realizaron mediante Dorado v1.4.0, permitiendo la conversión de las señales eléctricas en secuencias de nucleótidos y su asignación a los respectivos códigos de barras. Se estableció una profundidad mínima objetivo de 10.000 lecturas por muestra para el análisis de las comunidades microbianas. Posteriormente, se realizó la eliminación de cebadores mediante Cutadapt v5.2, seguida del filtrado de calidad y longitud, conservando lecturas con calidad Phred superiores a 10 (Q>10) y longitudes entre 1.000 y 1.700 pb para el gen 16S ARNr bacteriano, y entre 200 y 2.000 pb para la región ITS. La detección de secuencias quiméricas se realizó mediante VSEARCH v2.31.0, utilizando el algoritmo UCHIME_denovo, y se eliminaron las secuencias identificadas como quiméricas. Las secuencias bacterianas se clasificaron taxonómicamente mediante Emu v3.6.2 (Curry et al., 2022), utilizando como referencia la base de datos SILVA SSU 138.2 (Quast et al., 2013). Por su parte, las secuencias fúngicas se alinearon mediante Minimap2 v2.31 (Li, 2021), contra la base de datos UNITE (Kõljalg et al., 2013). Finalmente, los resultados taxonómicos se procesaron y visualizaron utilizando R 4.6.0 y RStudio 2026.04.0+526 (R Core Team, 2026), mientras que los análisis de diversidad alfa y beta se realizaron mediante MicrobiomeAnalyst 2.0 (Lu et al., 2023).

3.3. Evaluación ecotoxicológica de suelos tratados por biorremediación

Se utilizaron diferentes bioensayos para determinar los niveles de toxicidad residual aguda y crónica de los suelos luego de los 50 días de los ensayos de biorremediación en biopilas. Se evaluaron los tratamientos T1 (bioaumentación con el consorcio + bioestimulación de la microbiota nativa), T2 (sólo bioestimulación de la microbiota nativa del suelo), y T3 (atenuación natural), y además se incluyó un suelo control no contaminado. Los ensayos con *Daphnia magna*

se realizaron por duplicado y los ensayos con semillas de *Lactuca sativa* se realizaron por triplicado.

3.3.1. *Ensayos de toxicidad aguda*

La toxicidad aguda se evaluó usando como bioindicadores: 1) semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) (Linder et al., 1990), a través de la medición del porcentaje de germinación, la elongación de la radícula, y del hipocótilo; y 2) *Daphnia magna,* a través de la mortalidad al exponerse a los elutriados del suelo (OECD, 2004). Los elutriados consistieron en la fase acuosa que ha estado en contacto con el suelo durante 48 h en agitación (200 rpm, 25°C) en una proporción suelo:agua 1:4. Las partículas de suelo se eliminaron por centrifugación (10.000 rpm, 10 min, 4 °C). Se consideró el elutriado como el 100% y a partir de él se realizaron diluciones con agua ultrapura de 80%, 60%, 40% y 20% y un control con únicamente agua ultrapura (0%).

Los ensayos de toxicidad aguda con *Lactuca sativa* (ANASAC, Colombia) se realizaron por triplicado, utilizando tres placas de Petri independientes por cada dilución del elutriado (n=3), cada una con seis semillas, sobre papel de filtro humedecido con 5 mL de la dilución correspondiente. Cada placa constituyó una unidad experimental independiente del bioensayo, mientras que las semillas se consideraron unidades individuales de observación. Las cajas se incubaron en oscuridad durante 120 h a 25 °C, y se determinó después de este tiempo el porcentaje de germinación y la elongación de la radícula y del hipocótilo.

Los ensayos de mortalidad de *Daphnia magna* se realizaron por duplicado, utilizando dos vasos de precipitado independientes por cada dilución del elutriado (n=2), con diez organismos neonatos (≤24 h de edad) en cada uno. Cada vaso de precipitado constituyó una unidad experimental independiente del bioensayo, mientras que los organismos se consideraron unidades individuales de observación. Luego de las 24 y 48 horas se evaluó el porcentaje de mortalidad y

se determinó la concentración letal 50 (CL_{50}) de cada uno de los tratamientos, además se expresó en Unidades de Toxicidad Aguda (UTA) con la finalidad de conocer la toxicidad residual de cada uno de los tratamientos luego del proceso de biorremediación (Andreu-Sánchez et al. (2022)).

.

3.3.2. *Ensayos de toxicidad crónica*

La evaluación de la toxicidad crónica de los suelos sujetos a biorremediación se determinó evaluando el crecimiento de plantas de *L. sativa* en bandejas de germinación con un tamaño de alveolo de 3,8 cm de ancho, 3,8 cm de largo y 6 cm de alto (U.S. EPA, 1989). Para cada tratamiento (T1, T2, y T3) se sembraron seis semillas por alvéolo, con un total de tres alvéolos por cada tipo de suelo (n=3), considerándose una unidad experimental independiente. Las bandejas se almacenaron en condiciones ambientales, con iluminación no directa y humedad del 70% con riego por aspersión. La siembra de las semillas se realizó aproximadamente a 1 cm de la superficie del suelo. Durante el ensayo se registró del día de germinación de las semillas en cada tratamiento y al día 14 se evaluó el porcentaje de germinación, la elongación de la raíz, y el peso húmedo de las plántulas (Linder et al., 1990).

3.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la degradación del petróleo crudo, la producción de CO_2 y los ensayos ecotoxicológicos luego del proceso de biorremediación se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey a través del programa GraphPad-Prism v 11.0.0, teniendo en cuenta los datos estadísticamente significativos con valores de $p \leq 0.05$.

4. Resultados y discusión

4.1. Consorcio microbiano mixto degradador de petróleo crudo mediano

El desarrollo de consorcios microbianos permite la formación de uniones cooperativas, generando beneficios para las especies involucradas y para el proceso que se encuentran realizando. Sin embargo, estas especies compiten por el espacio y los recursos con el fin de sobrevivir al ambiente al cual se enfrentan. La elección de microorganismos anteriormente evaluados con altos niveles de tolerancia y ausencia de relaciones antagónicas entre sí favorece la formación de consorcios estables, evitando inhibición microbiana y la falta de supervivencia frente a un proceso de biodegradación de compuestos recalcitrantes como el petróleo crudo (Silva Monteiro et al., 2024). Las pruebas *in vitro* del antagonismo microbiano permitieron observar el efecto inhibitorio de la cepa bacteriana *Rhodococcus corynebacterioides* 18S hacia las tres cepas fúngicas *Aspergillus sydowii* H1, *Aspergillus oryzae* H3 y *Penicillium citrinum* H10 evaluadas (Tabla 1). Este género bacteriano ha sido previamente reportado con la producción de pigmentos bioactivos, como los carotenoides, los cuales han sido evaluados con posibles propiedades antimicrobianas, presentando actividad antibacteriana y antifúngica (Yürümez Canpolat y Artan Onat, 2025).

Las cepas bacterianas *Stutzerimonas stutzeri* PH5 y *Cellulosimicrobium cellulans* AB3 presentaron efectos inhibitorios frente al hongo filamentoso *Aspergillus sydowii* H1. Las cepas *Paenibacillus cellulositrophicus* 21S y *Rhodococcus qingshengii* PH3D no presentaron efecto antagónico sobre ninguna de las cepas fúngicas. Con respecto a las pruebas de antagonismo de hongos hacia bacterias, se produjo un efecto antagonista de la cepa *Aspergillus sydowii* H1 frente a *Stutzerimonas stutzeri* PH5, *Cellulosimicrobium cellulans* AB3. La actividad antagónica de la cepa *Aspergillus sydowii* H1 se asocia a reportes previos de esta especie con la producción de

metabolitos secundarios, como alcaloides, sesquiterpenoides y otros compuestos fenólicos, que presentan actividad antibacteriana y antifúngica contra hongos fitopatógenos (Yang et al., 2023).

Por otro lado, las cepas *Aspergillus oryzae* H3 y *Penicillium citrinum* H10 no presentaron efecto inhibitorio frente a las cepas bacterianas evaluadas. La adición del 0,1% de petróleo crudo en el medio M9 no afectó el efecto antagónico entre las cepas, al compararlas con las que crecieron sin el suplemento con hidrocarburo. Con base en el conocimiento previo a los elevados niveles de tolerancia de los hidrocarburos y la ausencia de relaciones antagónicas entre sí, las cepas seleccionadas para formar parte del consorcio microbiano mixto correspondieron a *Paenibacillus cellulositrophicus* 21S, *Stutzerimonas stutzeri* PH5, *Rhodococcus qingshengii* PH3D, *Cellulosimicrobium cellulans* AB3, *Aspergillus oryzae* H3 y *Penicillium citrinum* H10.

Tabla 1

Interacciones antagónicas entre cepas bacterianas y fúngicas en ensayos en placa.

	Antagonismo bacterias hacia hongos			**Antagonismo hongos hacia bacterias**		
	A. sydowii H1	*A. oryzae* H3	*P. citrinum* H10	*A. sydowii* H1	*A. oryzae* H3	*P. citrinum* H10
S. stutzeri PH5	+	-	-	+	-	-
C. cellulans AB3	+	-	-	+	-	-
R. qingshengii PH3D	-	-	-	-	-	-
P. cellulositrophicus 21S	-	-	-	-	-	-
R. corynebacterioides 18S	+	+	+	-	-	-

Nota: (+): Inhibición de crecimiento (antagonismo); (-): Sin inhibición de crecimiento (sin antagonismo).

Los microorganismos seleccionados en este estudio corresponden a cepas previamente descritas con capacidad para tolerar y degradar hidrocarburos pesados, al igual que alcanzar su mineralización, convirtiéndolos en fracciones más sencillas y menos tóxicas. Aunque las cepas bacterianas y fúngicas se evaluaron previamente como consorcios independientes (Barrera et al., 2026; Navas-Cáceres et al., 2023), este estudio logró el desarrollo de un consorcio microbiano mixto con potencial para integrar capacidades metabólicas complementarias en la transformación de hidrocarburos del petróleo.

Una de las principales razones para utilizar consorcios microbianos mixtos corresponde a la complejidad estructural del petróleo crudo, el cual se encuentra conformado por fracciones alifáticas, aromáticas, resinas y asfaltenos. Debido a esta heterogeneidad, los microorganismos individuales no poseen la capacidad de degradar por completo este contaminante. En contraste, los consorcios microbianos permiten una degradación sinérgica, basándose en capacidades metabólicas y genéticas más amplias, favoreciendo la ejecución de procesos biológicos más complejos de manera estable y robusta. Las interacciones entre hongos y bacterias presentan ventajas poco exploradas sobre los consorcios únicamente bacterianos o fúngicos. Estas interacciones favorecen el crecimiento mutuo, la supervivencia y tolerancia al estrés, transformando el entorno de los microorganismos a través de procesos biológicos, físicos y químicos (Rezaei y Moghimi, 2024). Las redes de micelio que forman las cepas fúngicas permiten el acceso al contaminante y estimulan el desarrollo y diseminación bacteriana. Al igual, las bacterias influyen en el crecimiento de las hifas fúngicas y a la protección de estos contra los parásitos (Espinosa-Ortiz et al., 2022).

Estudios han reportado una mayor expresión génica de genes que codifican para enzimas oxidativas intra y extracelulares cuando se utiliza un consorcio mixto, las cuales tienen una

influencia en la degradación de los hidrocarburos del petróleo, en especial en procesos que logran la mineralización del contaminante (Silva Monteiro et al., 2024). De igual forma, se ha demostrado que la degradación se produce mediante un proceso colaborativo en el cual los hongos inician la oxidación, generando compuestos más solubles y accesibles para las bacterias (Atakpa et al., 2022). Debido a estas ventajas, la tasa de degradación de los contaminantes tiende a aumentar en consorcios mixtos de bacterias y hongos.

4.2. Ensayo de biodegradación de petróleo crudo mediano utilizando el consorcio microbiano mixto desarrollado

4.2.1. *Eficiencia de degradación en biopilas a escala semipiloto*

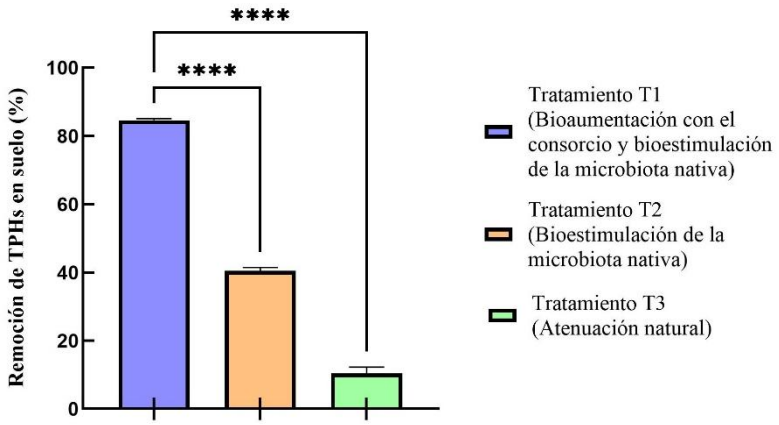
El porcentaje de remoción de los hidrocarburos extraíbles del petróleo en suelo tras un periodo de 50 días fue significativamente mayor (p <0,0001) en los suelos que se encontraban bioaumentados con el consorcio microbiano mixto desarrollado (tratamiento T1) (84,64%) en comparación con los suelos que únicamente se encontraban bioestimulados con salvado de trigo como agente texturizante (tratamiento T2) (40,52%) (Figura 1). En comparación con la adición del consorcio microbiano y la bioestimulación utilizando salvado de trigo, la microbiota nativa del suelo, sin ningún tipo de estimulación (tratamiento T3), alcanzó una remoción de los hidrocarburos extraíbles del petróleo del 11,76% en los ensayos en biopilas.

El petróleo crudo se clasifica como altamente complejo y tóxico para muchos microorganismos, por lo cual los suelos contaminados pueden ser ambientes hostiles para proliferación microbiana. Sin embargo, existe evidencia de que estas condiciones generan un ambiente selectivo donde hay crecimiento de especies de bacterias y hongos hidrocarbonoclastas que poseen potencial biotecnológico para ser evaluados y utilizados en procesos de biorremediación (Müller et al., 2026), lo cual ocurre en este estudio donde se seleccionaron

microorganismos nativos a partir de suelos impactados. Los microorganismos que conforman el consorcio mixto desarrollado en este trabajo han sido previamente aislados y evaluados en suelos contaminados con hidrocarburos pesados (Barrera et al., 2026; Navas-Cáceres et al., 2023) aunque no como un consorcio mixto y limitados a ensayos a escala de microcosmos. La importancia de evaluar su desempeño en condiciones más cercanas a las de campo radica en su capacidad para mantenerse estables y activos en una matriz más compleja, con condiciones menos controladas, donde dependen de más factores para mantener una elevada eficiencia de degradación.

Figura 1

Degradación de petróleo crudo mediano en suelos contaminado con 15.000 mg por kg de suelo tras un ensayo de biorremediación en biopilas de 50 días.



Nota: Los porcentajes se determinaron mediante cuantificación gravimétrica del material extraíble recuperado. Las barras de error representan los errores estándar de las medias (n = 2). **** $p <$ 0,0001.

Frecuentemente, el escalado de los microorganismos a un proceso en escala piloto o semipiloto puede presentar complicaciones relacionadas con la disminución de la viabilidad del inóculo, antagonismo con la microbiota nativa, limitaciones del oxígeno, deficiencia de humedad, ausencia de nutrientes, baja biodisponibilidad del contaminante y acumulación de metabolitos secundarios, que pueden causar toxicidad a los microorganismos responsables del proceso de degradación. Es por esto por lo que los procesos de escalado deben evaluar no solo el aumento en el porcentaje de degradación del contaminante, sino la estabilidad y adaptación del consorcio microbiano aplicado en el suelo, además de la evaluación de las condiciones óptimas para la realización de estos procesos de forma adecuada (Germaine et al., 2015). En este contexto, en este estudio se llevó a cabo un proceso de biorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo mediano utilizando biopilas, correspondiente a una tecnología *ex situ* sostenible que favorece la actividad microbiana a través de la aireación y estructura de condiciones como temperatura, humedad y adición de nutrientes, lo cual favorece el proceso de biodegradación. La eficiencia de esta técnica depende del control de estos parámetros y de las capacidades de los microorganismos inoculados (Ostovar et al., 2025). Para realizar y evaluar el proceso de biorremediación se utilizan distintas estrategias, las cuales se aplicaron en este estudio: atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación. La literatura reporta que la combinación de las últimas dos estrategias, bioestimulación y bioaumentación, aumenta la eficiencia de degradación al estimular la microbiota nativa y al consorcio microbiano altamente tolerante y adaptado al contaminante (Varjani y Upasani, 2019), lo cual corresponde con lo encontrado en el presente estudio donde el mayor porcentaje de remoción se logró en el tratamiento T1.

La evaluación del consorcio microbiano mixto en biopilas permitió determinar su desempeño en un sistema a escala semipiloto, bajo condiciones experimentales de mayor

complejidad que las utilizadas previamente en microcosmos. La inoculación del consorcio microbiano mixto en combinación con la bioestimulación alcanzó un porcentaje de degradación del 84,64% a partir de 15.000 mg de petróleo crudo mediano por kg de suelo, luego de un periodo de 50 días en biopilas de 5 kg de materia húmeda. Este valor fue significativamente más alto que el observado en el tratamiento únicamente bioestimulado (40,52%) ($p < 0,0001$). La mayor remoción de hidrocarburos observada en T1 respecto a T2 sugiere que la incorporación del consorcio microbiano mixto contribuyó favorablemente al desempeño de la biorremediación bajo las condiciones experimentales evaluadas. Otros estudios han reportado eficiencias de degradación similares a las de este estudio, sin embargo, se debe tener en cuenta las diferencias en la complejidad del hidrocarburo, la concentración del contaminante, el tiempo de tratamiento y el tipo de bioestimulante utilizado en dichos estudios. Por ejemplo, se han reportado consorcios bacterianos que han logrado una eficiencia de degradación del 79% durante 42 días de aproximadamente 3.500 mg de hidrocarburos totales del petróleo por kg de suelo, utilizando salvado rojo, como un aditivo bioestimulante, para mejorar las condiciones del suelo y los microorganismos en la degradación (P. F. Liu et al., 2021). Otro estudio demostró una eficiencia de degradación cercana al 99% a partir de 64.000 mg por kg de suelo en escala de campo luego de 150 días usando consorcios bacterianos, compostaje de estiércol, aserrín como agente texturizante y macro y micronutrientes añadidos (Helmy y Kardena, 2024). También se demostró una eficiencia de degradación del 96% a partir de 2.500 mg por kg en biopilas de 5 toneladas luego de 28 días usando bioestimulantes que contenían consorcios bacterianos y compuestos químicos como nutrientes del suelo, más bagazo de caña como agente texturizante (Tsai et al., 2025). En comparación con estos estudios, la eficiencia observada por el consorcio microbiano desarrollado es relevante debido a los altos niveles de contaminación que se encontraban en el suelo, el corto

tiempo empleado para realizar el ensayo y la utilización de un solo residuo agroindustrial sin una suplementación nutricional compleja adicional.

Los resultados de eficiencia de degradación se relacionan directamente con las capacidades metabólicas de los microorganismos que conforman el consorcio microbiano mixto. Todas las especies han sido evaluadas previamente por su tolerancia y capacidad de utilizar hidrocarburos pesados como fuente carbono y energía, promoviendo la degradación de contaminantes. Las especies bacterianas *Rhodococcus qingshengii, Stutzerimonas stutzeri* y *Cellulosimicrobium cellulans* se han asociado a la degradación del petróleo crudo y sus derivados a través de la producción de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares (Iminova et al., 2022; Parthipan et al., 2017; Nkem et al., 2016). Las especies fúngicas *Aspergillus oryzae* y *Penicillium citrinum* se han reportado en estudios por presentar elevada tolerancia y eficiencia de degradación frente a mezclas de hidrocarburos a través de enzimas como dioxigenasas, lacasas, y peroxidasas (Asemoloye et al., 2020; Kumar et al., 2023). Debido a las capacidades metabólicas descritas previamente para las especies que forman el consorcio, la degradación del petróleo crudo podría estar relacionada con la oxidación de alcanos y aromáticos mediante alcano-hidroxilasas, monooxigenasas, citocromo P450 y dioxigenasas, al igual que la actividad de enzimas extracelulares oxidativas como lacasas y peroxidasas, favoreciendo la transformación de fracciones más complejas y menos biodisponibles del petróleo (Raganati et al., 2023; Rezaei y Moghimi, 2024). Sin embargo, a pesar de los antecedentes relacionados a la capacidad de degradación de hidrocarburos, hasta donde se conoce, las especies que conforman el consorcio microbiano mixto no han sido reportadas previamente en ensayos de degradación en biopilas con petróleo crudo. En conjunto, estos resultados posicionan al consorcio microbiano mixto como una

alternativa sostenible para la biorremediación de suelos contaminado con petróleo a una escala cercana a condiciones de campo.

4.2.2. *Análisis fisicoquímicos de los suelos biorremediados tras el proceso aplicado*

El contenido de COT y MOT tuvo un incremento significativo después de los tratamientos de biorremediación aplicados, particularmente aquellos bioestimulados y bioaumentados (T1 y T2) (Tabla 2). Este comportamiento se puede relacionar con la adición del salvado de trigo, el cual cumple el papel de enmienda orgánica y agente texturizante, aportando carbono orgánico, al igual que mejora la porosidad, aireación y retención de agua, incrementando así la formación de biopelículas, colonización y crecimiento microbiano (Sosulski et al., 2025). De la misma manera, el contenido de NT presentó un incremento después de aplicar los tratamientos T1 y T2, mientras que el tratamiento de atenuación natural (tratamiento T3) generó una disminución. Los incrementos en el contenido de nitrógeno podrían relacionarse con el aporte de nutrientes dado por el residuo agroindustrial, lo cual genera una mayor actividad por parte del consorcio inoculado, generando modificaciones en la dinámica del nitrógeno durante la biorremediación. La proliferación de microorganismos en los suelos biorremediados podría potenciar la actividad de microorganismos diazótrofos y a la fijación del nitrógeno, aumentando su disponibilidad y mejorando las características del suelo. Esta mayor disponibilidad de nitrógeno se ha reportado favoreciendo la degradación de hidrocarburos, especialmente de los compuestos aromáticos contribuyendo a su restablecimiento (Ou et al., 2025).

El FD presentó una dinámica diferencial entre los tratamientos, aumentando después de los tratamientos T1 y T3, pero manteniendo valores similares a los iniciales después del tratamiento T2. El aumento del FD en todos los tratamientos a excepción del cual se encontraba únicamente bioestimulado (tratamiento T2), sugiere que la dinámica del fósforo en el suelo durante la

biorremediación no solo depende del proceso de degradación del contaminante y los microorganismos degradadores, sino también de la movilización microbiana del fósforo. En el tratamiento T2, la adición del salvado de trigo estimuló el crecimiento de la microbiota nativa y promovió la inmovilización del fósforo en biomasa microbiana, disminuyendo la fracción disponible del mineral. En el tratamiento T1, el consorcio microbiano inoculado permitió la compensación de este efecto al favorecer la solubilización de fosfato a través de la producción de ácidos orgánicos y fosfatasas. El incremento del FD en el tratamiento T3 puede indicar una recuperación parcial del ciclo del fósforo en el suelo por parte de los microorganismos nativos y adaptados al contaminante, pero presentando poca demanda biológica, generando una permanencia del fósforo disponible, no siendo un indicador de una remediación eficiente (Zhou et al., 2025).

Tabla 2

Propiedades fisicoquímicas evaluadas de los suelos antes y después de los ensayos de biorremediación de 50 días en biopilas

	Suelo previo al ensayo de biorremediación		**Suelo luego del ensayo de biorremediación**		
Variables	Suelo contaminado	Suelo no contaminado	Tratamiento T1	Tratamiento T2	Tratamiento T3
COT (%)	10,41	12,65	13,37	13,73	11,58
MOT (%)	17,95	21,81	23,05	23,67	19,96
NT (%)	0,654	0,712	0,767	0,864	0,555
FD (ppm)	7,719	2,807	11,228	7,719	10,526
pH	6,58	5,15	5,48	5,68	5,97
Textura	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso

Nota: (COT): carbono orgánico total; (MOT): materia orgánica total; (NT): nitrógeno total; (FD): fósforo disponible.

Con respecto al pH, se presentó una disminución en todos los tratamientos respecto al suelo contaminado inicial, considerándose suelos moderadamente ácidos. Esta disminución puede ser asociada a la degradación aerobia del petróleo crudo, donde se generan alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos que pueden acidificar la matriz. Sin embargo, no se generaron ambientes extremadamente ácidos, lo cual es compatible con la actividad microbiana (Omenna et al., 2025). Finalmente, la textura del suelo se mantuvo constante como franco arenoso en todos los tratamientos al final del ensayo. Estos resultados indican que el proceso de biorremediación no alteró las proporciones de arena, limo y arcilla en el suelo, lo cual corresponde con estudios que afirman que esta propiedad fisicoquímica del suelo es estable y no se modifica con procesos de corto plazo en el suelo. La textura franco arenosa resulta favorable para la biorremediación del petróleo crudo, debido a que facilita el drenaje de agua, posee mayor porosidad y mejora la difusión del oxígeno en las biopilas, siendo estas características que ayudan al proceso y contribuyen a aumentar la remoción del contaminante (Haghollahi et al., 2016).

4.2.3. *Formación de intermediarios de degradación a partir del petróleo crudo mediano por parte del consorcio microbiano mixto*

A partir de los resultados gravimétricos, se determinó que el tratamiento T1, inoculado con el consorcio microbiano, alcanzó el mayor porcentaje de remoción y eficiencia de degradación. Debido a que la biorremediación busca generar productos menos tóxicos que los originales, o incluso llegar de degradarlo en sus fracciones más simples, resulta esencial conocer los compuestos intermediarios generados por los microorganismos del consorcio a partir del petróleo crudo.

Tabla 3

Abundancia de grupos funcionales detectados por GC-MS en suelos contaminados con petróleo y tratados por biorremediación en biopilas

	Abundancia relativa de compuestos identificados mediante GC-MS (%)									
Grupo funcional	**Antes del tratamiento**		**T1**					**T2**	**T3**	**Cont.**
	Suelo no contaminado	**Suelo contaminado**	**Dia 10**	**Dia 20**	**Dia 30**	**Dia 40**	**Dia 50**	**Dia 50**	**Dia 50**	**Día 50**
Alcano lineal	100	91,7	59,7	78,6	94,7	85,3	84,8	86,5	69,8	100
Cetona/esteroide	0	0	3,9	6,1	0	4,4	4,7	0	0	0
Aromáticos	0	2,9	0,7	0	0	0	0	0	0	0
Isoprenoides	0	5,4	6,2	5,8	2,7	3,8	3,8	4,5	4,8	0
Ácidos grasos	0	0	22,2	0	0	0	0	2,3	7,9	0
Ésteres	0	0	7,3	9,5	2,6	6,7	6,7	6,7	17,5	0

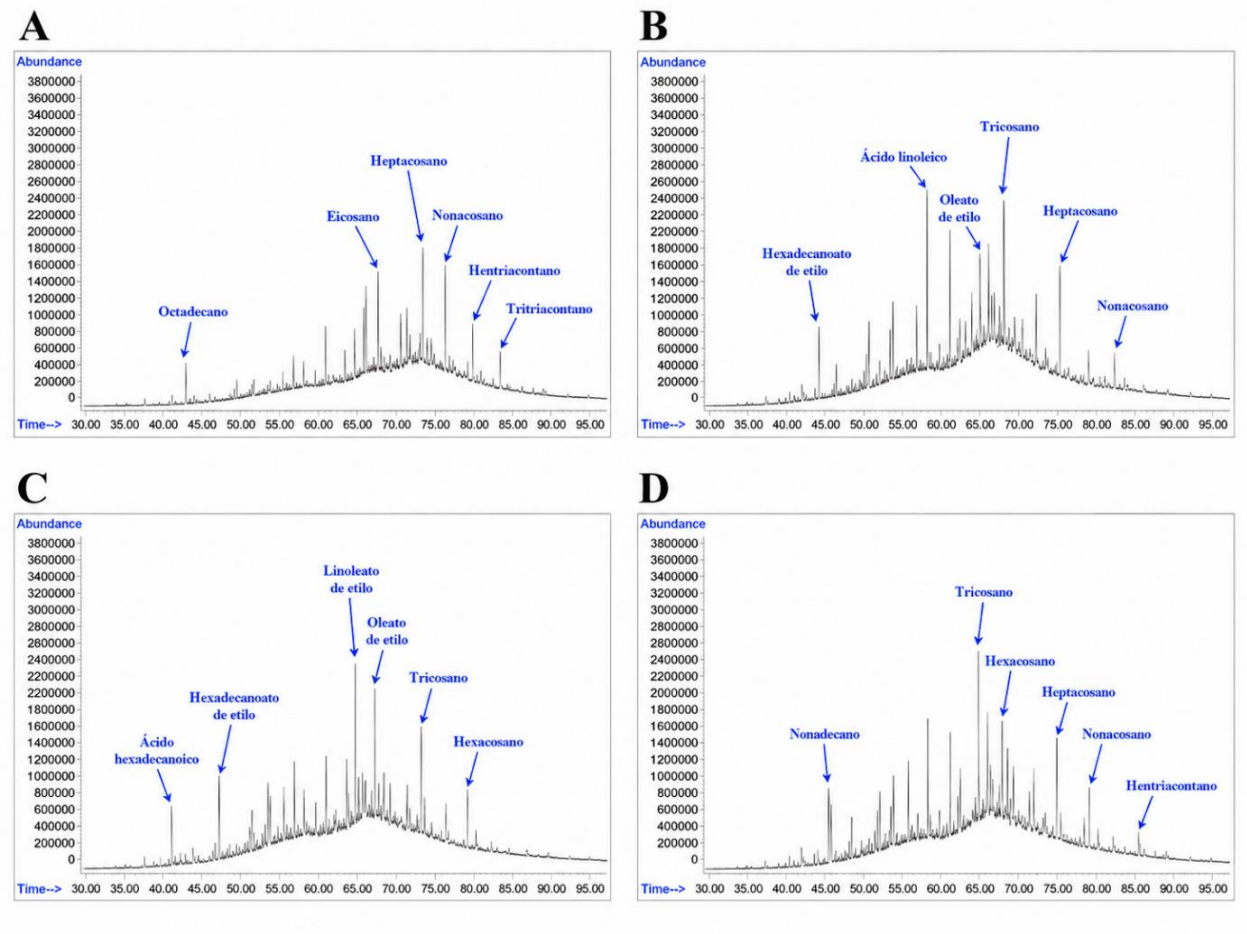
Nota: Cont: Control de crecimiento.

Con relación al suelo previo al ensayo de biorremediación, el suelo que se encontraba contaminado poseía un perfil abundante en compuestos correspondientes a alcanos lineales entre 16 y 33 carbonos (Figura 2A), con abundancias relativas de hasta 91,7% (Tabla 3). Dentro de este grupo funcional, los compuestos con mayor porcentaje correspondieron a heptacosano, hexacosano y tetracosano (Apéndice D). Además, se detectaron isoprenoides como el pistano y el fitano, compuestos que son utilizados como marcadores dentro del petróleo debido que son persistentes en el ambiente por su alta resistencia a la degradación. Por otro lado, suelo sin contaminar presentó una cantidad relativa del 100% de alcanos lineales, los cuales pueden corresponder a compuestos que se encontraban de forma natural en el suelo, como ceras vegetales o materia orgánica. Estos compuestos también aportan al porcentaje reportado de hidrocarburos

en el suelo contaminado. Este patrón en los compuestos detectados coincide con el encontrado en el suelo sin contaminar al día 50 (Apéndice E), compuesto en un 100% por alcanos lineales no derivados del petróleo (Vecchiato et al., 2017).

Figura 2

Cambios en el perfil cromatográfico de la fracción volátil y semi-volátil de petróleo crudo mediano en el suelo durante 50 días de tratamiento con el consorcio microbiano mixto (Tratamiento T1).



Nota: (A): suelo contaminado antes del tratamiento; (B): día 10 del tratamiento; (C): día 30 del tratamiento; (D): día 50 del tratamiento.

La inoculación del consorcio microbiano (tratamiento T1) generó cambios en la composición de los hidrocarburos desde el día 10 del tratamiento (Figura 2B). Los alcanos lineales iniciales disminuyeron a una cantidad relativa de 59,7% (Tabla 3) y aparecieron compuestos oxigenados como el ácido hexadecanoico, ácido linoleico, ácido oleico, hexadecanoato de etilo, linoleato de etilo y oleato de etilo. Estos resultados podrían estar relacionados con la actividad enzimática de los microorganismos, principalmente de reacciones de oxidación asociadas a enzimas de tipo monooxigenasa y dioxigenasa (Cabral et al., 2022). Un ejemplo corresponde a la enzima alcano monooxigenasa, la cual ha sido descrita su producción en algunas de las bacterias que conforman el consorcio, en especial en el género *Rhodococcus*. Esta enzima podría encargarse del inicio de la transformación de alcanos lineales hasta llegar a ácidos grasos que podrían integrarse en el metabolismo central a través de la β-oxidación (Guo et al., 2023).

Al día 20 del ensayo, en el tratamiento T1 se presentó una ausencia de ácidos grasos (Apéndice E), resultado que se ve cuantificado en el Apéndice D. La desaparición de estos compuestos puede sugerir que no se acumularon como productos finales, sino que fueron transformados por los microorganismos al ingresar al metabolismo central. En este día se observó un aumento en la proporción de los alcanos lineales y de los ésteres, lo cual indica que el proceso se encontraba en una fase transitoria y activa de transformación y degradación de los hidrocarburos. Por el contrario, al día 30 se detectó una disminución en los compuestos asociados a los ésteres e isoprenoides (Figura 2C). Los resultados se relacionan con rutas reportadas de degradación donde la oxidación subterminal de alcanos puede generar ésteres que posteriormente pueden ser hidrolizados, al igual que el inicio de una transformación progresiva de estas fracciones persistentes (Rojo, 2009).

Los resultados de la transformación dinámica del petróleo crudo mediano a través de la inoculación del consorcio microbiano mixto permitieron determinar que los alcanos lineales se consolidaron como la fracción más abundante en el perfil cromatográfico, siendo la fracción más resistente que pudo ser detectada. Los ésteres presentaron variaciones en su abundancia relativa durante el tratamiento, relacionado con posibles procesos de formación y transformación de estos compuestos. Finalmente, la aparición de los ácidos grasos únicamente al día 10 sugiere que estos intermediarios son consumidos rápidamente o llevados a rutas metabólicas como la β-oxidación (Kristensen et al., 2021). Estos resultados se complementan con los datos de producción de CO_2 durante los 50 días del ensayo (Apéndice C). Se observa que la producción de CO_2 máxima se dio entre los días 10 y 12, lo cual coincide con el día en el cual se detectó la mayor producción de compuestos intermediarios. Existe una asociación entre los resultados con la activación metabólica inicial del consorcio, relacionada a la degradación de las fracciones más biodisponibles del petróleo. De igual forma, el tratamiento T1 corresponde al mayor productor de CO_2, con aproximadamente 19 mg CO_2 g^{-1} IDM al día 50, indicando una posible utilización del petróleo crudo mediano como fuente de carbono y energía, siendo un indicador indirecto de la mineralización de estos compuestos, resultados que también se correlacionan con la disminución del porcentaje de hidrocarburos en el suelo hallado en las pruebas de gravimetría. Lo anterior permite inferir que esta producción de CO_2 y la generación de intermediarios se asocia al con una mayor actividad metabólica durante el tratamiento T1, lo cual se relaciona con la reducción del porcentaje de hidrocarburos y no únicamente a la metabolización de la materia orgánica presente en el suelo (Plaza et al., 2005).

4.2.4. *Estructura y diversidad de las comunidades microbianas durante el proceso de biorremediación en biopilas*

4.2.4.1. Sucesión de las comunidades bacterianas durante el proceso de biorremediación. Durante el ensayo de biorremediación en biopilas aplicando el consorcio microbiano mixto, las comunidades bacterianas evidenciaron una reestructuración en su abundancia taxonómica que depende no solo de los tratamientos aplicados, sino del tiempo, la concentración de hidrocarburos, los nutrientes y la disponibilidad de oxígeno dentro de las biopilas (Figura 3). Estos resultados se relacionan con estudios que demuestran que la actividad microbiana durante el proceso de biorremediación depende de factores bióticos y abióticos, y el control de estos factores afectará en el crecimiento y adaptación de los microorganismos presentes en el proceso (Mayans et al., 2024). La comunidad bacteriana inicialmente se encontraba con una estructura formada y especializada por la presión de los hidrocarburos del petróleo, dominada por el género *Rhodococcus* (Figura 3B). Se ha descrito previamente este género en estudios de degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, donde se ha reportado la presencia de genes que codifican para enzimas que se relacionan con la degradación de hidrocarburos del petróleo (Brzeszcz et al., 2023). Sin embargo, al realizar la aplicación del consorcio microbiano, esta dominancia fue sustituida por una comunidad más distribuida entre diferentes grupos bacterianos.

En el tratamiento T1, los géneros *Rhodococcus* y *Paenibacillus*, pertenecientes al consorcio microbiano mixto, se encontraban presentes dentro de los primeros quince géneros más abundantes, sugiriendo que estos microorganismos no llegaron a dominar o desplazar las comunidades nativas del suelo sino a integrarse dentro de la comunidad bacteriana que ya existía previamente en el suelo. Los microorganismos inoculados favorecieron la modificación de la estructura de la comunidad bacteriana, aumentando la diversidad alfa de las muestras (Figura 4A), donde la introducción del consorcio microbiano se asoció a una comunidad más diversa en

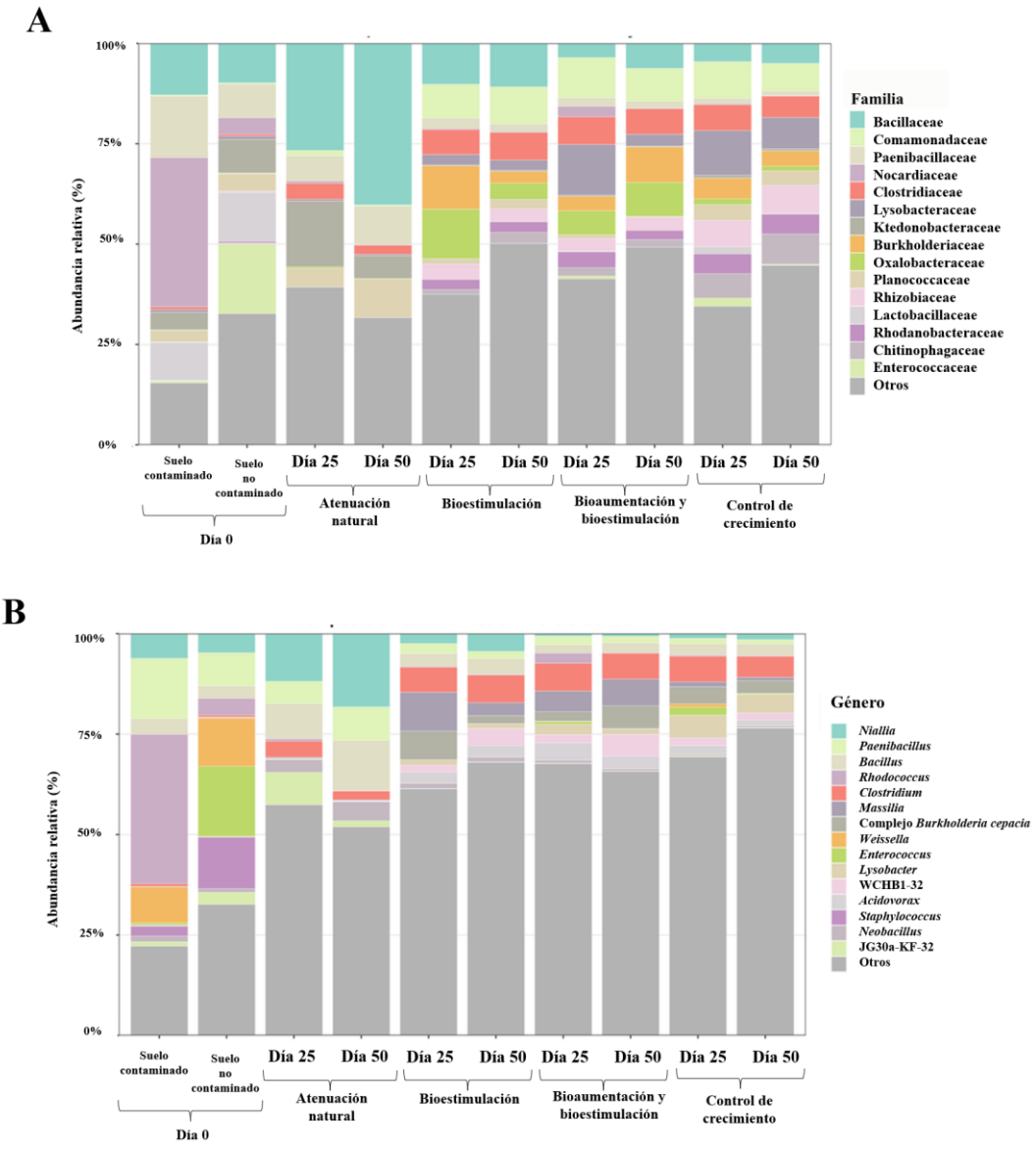
comparación al suelo previo al ensayo de degradación (M. Wu et al., 2019). Otros géneros de importancia en este tratamiento corresponden, en el día 25 a *Clostridium*, *Massilia*, *Acidovorax*, *Lysobacter* y *Rhodococcus*. En el día 50 se observaron los géneros *Massilia, Clostridium,* el complejo *Burkholderia Cepacia,* WCHB1-32 y *Acidovorax.* Los géneros como *Massilia* y el complejo *Burkholderia Cepacia* se relacionan con los resultados de los ensayos fisicoquímicos (Numeral 4.2.2.), debido a previos reportes de actividad fijadora de nitrógeno, asociado a la recuperación de los ciclos biológicos en el suelo y aumento en la disponibilidad de nutrientes (Madhaiyan et al., 2021). El aumento de la diversidad bacteriana a lo largo del tiempo (Figura 4B), se asocia a una reorganización progresiva de géneros hidrocarbonoclasta dominantes en las etapas iniciales, pero también al establecimiento en fases posteriores de otros taxones que han sido capaces de sobrevivir a las condiciones, interactuar positivamente con los otros microorganismos nativos del suelo, crecer y colonizar el ambiente en el cual se encuentran (Martínez-Cuesta et al., 2023).

A diferencia del tratamiento T1, el tratamiento únicamente bioestimulado (tratamiento T2) presentó diferencias en la sucesión bacteriana. En el día 25, se presentó mayor abundancia de géneros como *Massilia,* el complejo *Burkholderia cepacia, Clostridium, Bacillus* y *Acidovorax,* los cuales se encuentran relacionados a las primeras fases de la biorremediación, especialmente cuando existe mayor disponibilidad de nutrientes producto de la adición del residuo agroindustrial y de fuentes de carbono alternas más simples. Sin embargo, al día 50 hay una reorganización de la comunidad microbiana a partir de la disminución en la abundancia de géneros como *Massilia* y el complejo *Burkholderia cepacia*, con un aumento en la abundancia de géneros como *Clostridium, Niallia* y WCHB1-32*,* lo cual sugiere una sucesión inducida por las condiciones ambientales en las biopilas de comunidades no especializadas en la degradación de compuestos recalcitrantes,

sino en la supervivencia a condiciones adversas, como lo es la limitación de oxígeno y nutrientes, cambios en la humedad del suelo o presencia de compuestos tóxicos (Udume et al., 2023).

Figura 3

Abundancia relativa de las comunidades bacterianas presentes en las muestras de suelo evaluadas en los ensayos de biorremediación en biopilas a nivel taxonómico de (A) familia y (B) género.



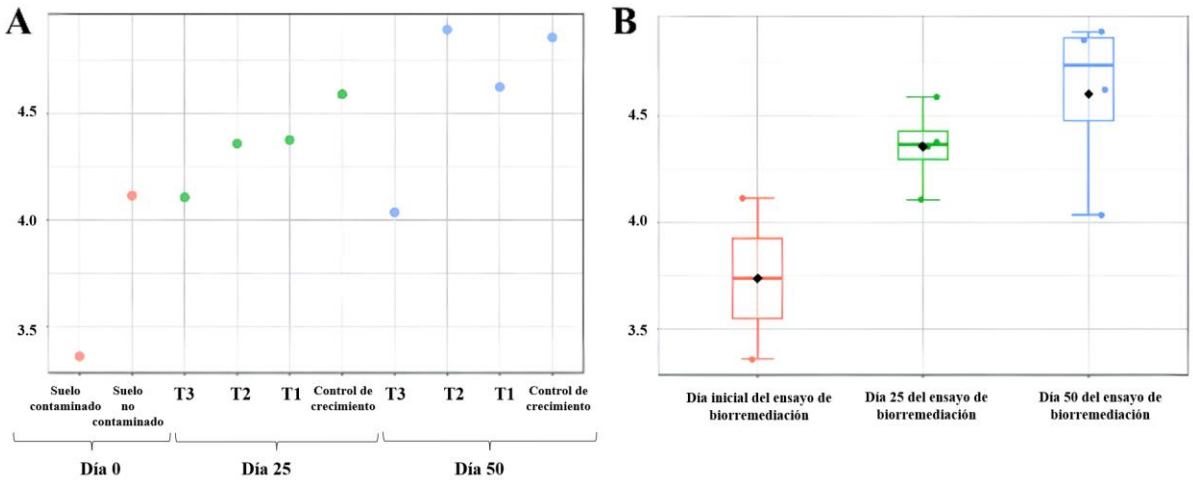
En contraste con los tratamientos anteriormente mencionados, el tratamiento de atenuación natural (tratamiento T3) presenta una dominancia por parte de la familia Bacillaceae durante los 50 días del ensayo, sugiriendo que al no introducirse una fuente de carbono alterna o una estimulación del suelo, se presentó mayor abundancia relativa de bacterias asociadas a la formación de estructuras de resistencia, las cuales son ampliamente reportadas en literatura con capacidad de adaptación a contaminantes tóxicos, como la formación de estructuras como endosporas (Al Hoqani et al., 2025). Comparado con los tratamientos T1, T2, y T3, el control de crecimiento mostro una comunidad bacteriana altamente diversa, donde ningún género presentó una dominancia marcada, lo cual sugiere una menor presión selectiva como se evidencia en los suelos que poseen hidrocarburo. Sin embargo, el suelo no contaminado no presentó una comunidad microbiana estática, ya que los microbiomas del suelo son sistemas dinámicos que cambian con el tiempo en respuesta a variaciones ambientales como la disponibilidad de nutrientes, humedad, pH, materia orgánica y temperatura (Argiroff et al., 2024).

El análisis de coocurrencia a nivel de género (Apéndice F) evidencia una comunidad bacteriana con un alto número de asociaciones positivas entre los diferentes géneros, principalmente *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Niallia*, *Neobacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Sporosarcina* y *Peribacillus*, los cuales se asocian a géneros conocidos por su actividad degradadora y de tolerancia ante estrés ambiental. Los resultados sugieren que durante el proceso de biorremediación en biopilas, estos microorganismos coexisten bajo las condiciones ambientales creadas, aportando a la degradación de los hidrocarburos del petróleo a través de la complementariedad y cometabolismo, y que probablemente el proceso no está siendo desarrollado por un único organismo sino por una comunidad estructurada que se va especializando con el paso del tiempo. Este patrón es consistente con estudios realizados en suelos contaminados con petróleo,

donde los análisis han mostrado que la contaminación y las estrategias de biorremediación utilizadas modifican la diversidad microbiana y aumentan la complejidad de las redes de coocurrencia, afirmando que se generan interacciones microbianas potencialmente más complejas bajo presión inducida por el petróleo crudo, generándose un proceso de reorganización ecológica del microbioma de la matriz del suelo (Zhuang et al., 2023).

Figura 4

Índice de Shannon para diversidad alfa por (A) muestras individuales y (B) muestras agrupadas por días del ensayo de degradación para las comunidades bacterianas de los suelos evaluados en los ensayos de biorremediación.



4.2.4.2. Sucesión de las comunidades fúngicas durante el proceso de biorremediación.

El análisis de las comunidades fúngicas permitió observar que la reestructuración de los taxones se encuentra marcada por los distintos tratamientos aplicados para la biorremediación y del tipo de suelo (Figura 5). A diferencia de las comunidades bacterianas, los suelos previos al tratamiento se biorremediación se encontraban dominados por el género *Aspergillus*, representando el 91% de

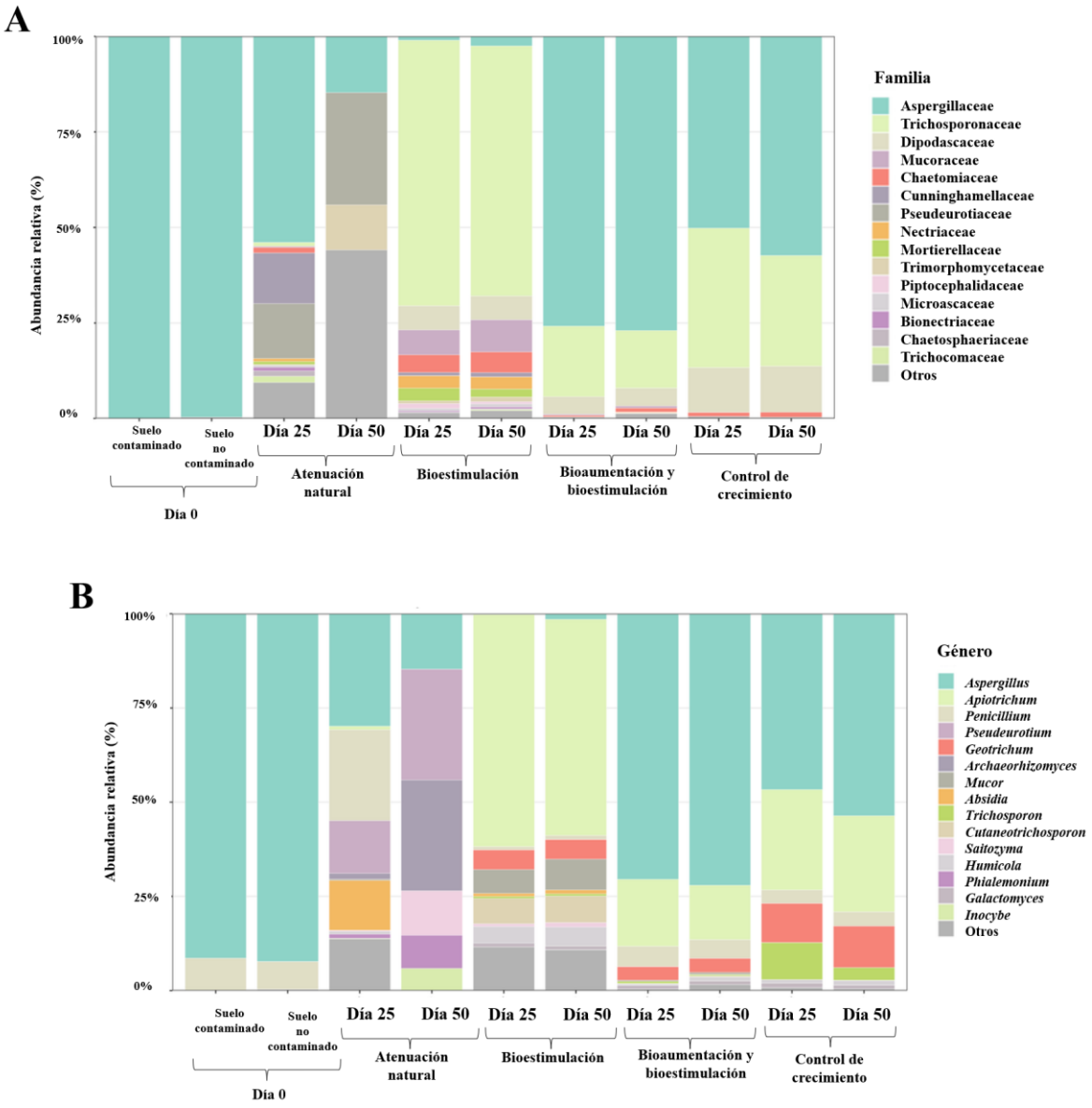
la comunidad fúngica en el suelo contaminado y del 92% en el no contaminado. La dominancia por parte de este género se ve reflejada en los valores de diversidad alfa con el índice de Shannon (Figura 6), donde se observa que los suelos antes del tratamiento poseían comunidades poco equitativas y dominadas por un pequeño número de taxones. Los resultados indican que este género se encuentra presente en la microbiota nativa del suelo desde antes del proceso de biorremediación, incluso en suelos no contaminados. *Aspergillus* se encuentra ampliamente distribuido en ambientes terrestres, múltiples especies han sido aisladas de esta matriz debido a su capacidad de adaptación a condiciones edáficas variables (Nji et al., 2023).

Al analizar el tratamiento inoculado con el consorcio microbiano, se presentó una dominancia de la familia Aspergillaceae; a nivel de género, *Aspergillus* presentó valores de abundancia relativa mayores al 70% al igual que el género *Penicillium,* el cual estuvo presente en los géneros más abundantes a lo largo del tiempo. Estos datos sugieren que la comunidad introducida fue capaz de permanecer a lo largo del proceso de biorremediación en el suelo, generando una comunidad fúngica muy similar a la observada en los suelos previos al tratamiento y a los controles de un suelo no contaminado. Los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son conocidos como hongos saprofíticos, con capacidad de transformar la materia orgánica del suelo. En relación con los hidrocarburos del petróleo, estos géneros se han reportado con actividad de biodegradación del petróleo y de la presencia de genes que codifican para la degradación de compuestos aromáticos (Asemoloye et al., 2020; Bishnoi et al., 2024). De igual forma, la dominancia de esta familia de hongos puede estar relacionada a la capacidad de tolerar las condiciones de estrés ambiental generado por la contaminación, potenciar la degradación del contaminante y finalmente, reorganizar las comunidades microbianas para la recuperación funcional del suelo (Fallahi et al., 2023). Los cambios en la composición de la comunidad fúngica durante el tratamiento T1 sugieren

una reorganización de los grupos taxonómicos presentes, incluidos géneros previamente relacionados con la degradación de hidrocarburos.

Figura 5

Abundancia relativa de las comunidades fúngicas presentes en las muestras de suelo evaluadas en los ensayos de biorremediación en biopilas a nivel taxonómico de (A) familia y (B) género.



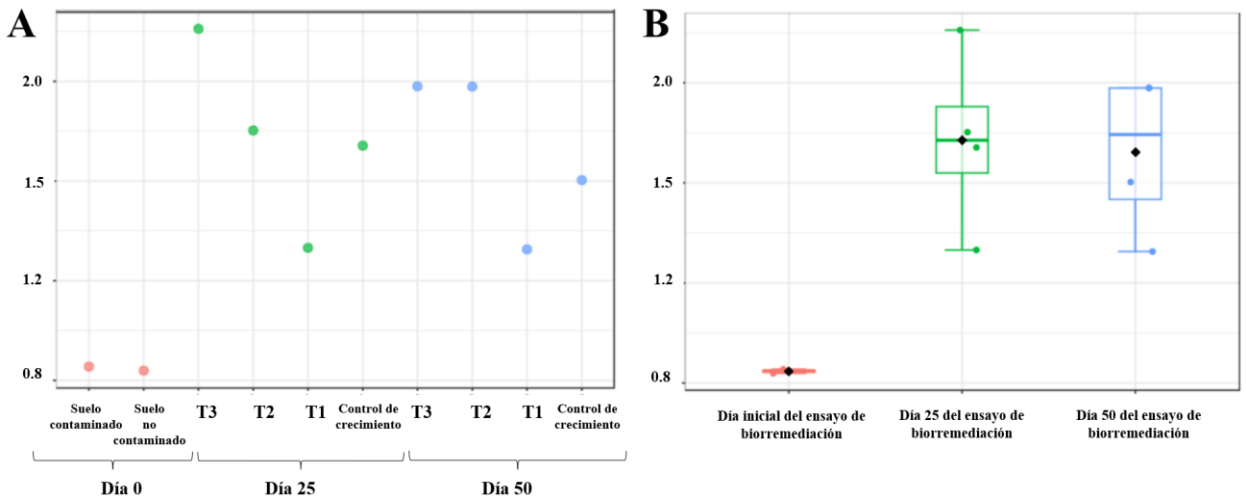
Al comparar con los otros tratamientos, el tratamiento únicamente bioestimulado (T2) presentó sucesiones fúngicas distintas, donde la comunidad estuvo dominada por la familia Trichosporonaceae, especialmente por el género *Apiotrichum*. Estos resultados son producto de la adición del salvado de trigo como residuo agroindustrial, el cual pudo generar compuestos orgánicos que permitieran el crecimiento y colonización de este género fúngico, al ser ampliamente reportado con presencia de enzimas hidrolasas que les permite sobrevivir con distintas fuentes de carbono, en especial azúcares (Gargouri et al., 2015). En relación con el tratamiento de atenuación natural, se evidenció una sucesión de la comunidad respecto a los suelos antes del proceso de biorremediación, con una disminución de la abundancia relativa de la familia Aspergillaceae y un aumento de otras familias como Pseudeurotiaceae y Cunninghamellaceae. Los cambios presentados en la comunidad microbiana se ven reflejados en el aumento de la diversidad alfa, donde al día 25 el tratamiento de atenuación natural se presentan los valores más altos de todos los tratamientos, indicando que se favoreció a una comunidad más heterogénea, generando una posible asociación al uso de materia orgánica residual del suelo, compuestos derivados de la degradación del hidrocarburo por parte de las especies nativas degradadoras y la adaptación de estos microorganismos a ambientes hostiles.

El análisis de coocurrencia y anti-ocurrencia de todas las muestras de suelo a nivel de género mostró una red en su mayoría con interacciones positivas entre los géneros *Apiotrichum*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Trichosporon*, *Humicola*, *Penicillium* y *Mucor,* evidenciando la capacidad de estos géneros para crecer y generar relaciones metabólicas favorables para el proceso (Apéndice G). Destaca el género *Penicillium* el cual presentó una posición central en la red, el cual puede ser un actor clave para la coexistencia entre los otros géneros presentes en el suelo, permitiendo que se den las asociaciones positivas entre ellos. Se observa también una correlación

negativa entre los géneros *Aspergillus* y *Mucor*, lo cual podría generar relaciones antagónicas con relación a la diferencia de nicho entre estos dos géneros, lo cual puede ser dado por una competencia por sustratos o diferencia en la velocidad de crecimiento (Boddy y Hiscox, 2016). Los datos se relacionan con lo encontrado en la Figura 5, donde el género *Aspergillus* presentó mayor abundancia en los suelos iniciales y el tratamiento bioaumentados, mientras que *Mucor* en el tratamiento bioestimulado, donde la dominancia de *Aspergillus* disminuía.

Figura 6

Índice de Shannon para diversidad alfa por (A) muestras individuales y (B) muestras agrupadas por días del ensayo de degradación para las comunidades fúngicas de los suelos evaluados en los ensayos de biorremediación.



4.3. Reducción de la toxicidad de los suelos biorremediados

La disminución de la concentración de los hidrocarburos del petróleo en el suelo no siempre se correlaciona con la reducción proporcional de la toxicidad, debido a que pueden

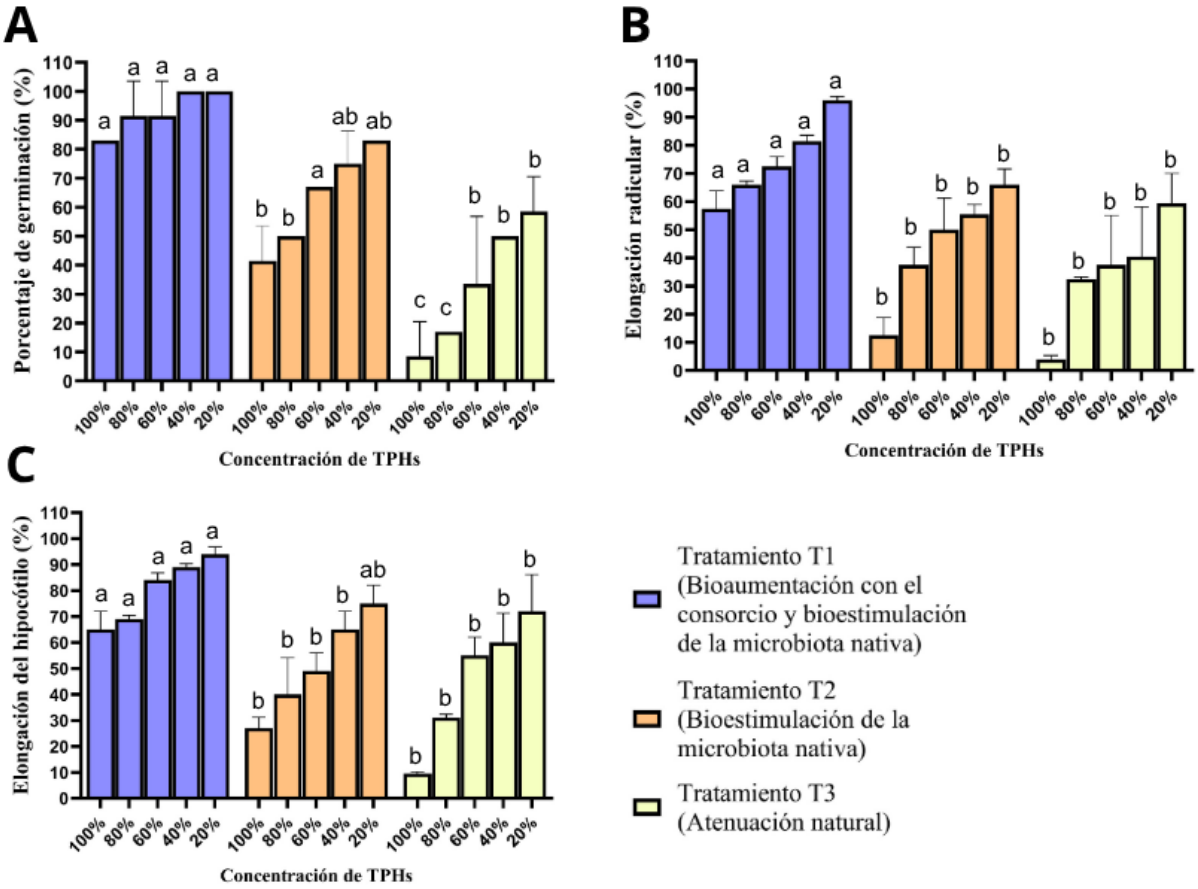
generarse metabolitos intermedios más tóxicos o pueden persistir fracciones polares residuales. Por lo tanto, la evaluación de la ecotoxicidad resultó una herramienta esencial para determinar los efectos que presentan los suelos biorremediados sobre las plantas y organismos acuáticos, generando información sobre la recuperación funcional del suelo, y confirmó que los hidrocarburos del petróleo afectan significativamente a los dos bioindicadores (*L. sativa* y *D. magna*), generando un efecto tanto en los elutriados (toxicidad aguda) como en la fracción sólida del suelo (toxicidad crónica).

4.3.1. *Disminución de la toxicidad aguda en suelos.*

Los niveles de toxicidad aguda en suelos contaminados disminuyeron después de la biorremediación con biopilas, particularmente después del tratamiento inoculado con el consorcio microbiano mixto (tratamiento T1) (Figura 7 y Tabla 4). El elutriado se ha reportado como un complemento para evaluar la toxicidad aguda, debido a que la reducción de los hidrocarburos no significa una detoxificación completa, y muchas veces se pueden generar compuestos intermedios que persisten y generan una mayor contaminación que la inicial (Diogo et al., 2023). La germinación de las semillas de lechuga fue significativamente mayor (p = 0,0017) en los suelos del tratamiento T1, alcanzando el 80% incluso en condiciones de elutriado al 100%, mientras que la germinación fue del 39% en el tratamiento T2 y solo del 9% en el tratamiento T3. La elongación de la radícula siguió una tendencia similar, con valores máximos después del tratamiento T1 (94%), seguido del tratamiento T2 (65%) y tratamiento T3 (60%) en la concentración de elutriado más baja. Los valores de elongación del hipocótilo solo difirieron significativamente bajo la concentración de elutriado más alta (100%), con porcentajes del 66% para el tratamiento T1, 29% para el tratamiento T2 y 10% para el tratamiento T3 en comparación con el control; no se observaron diferencias significativas en concentraciones de elutriado más bajas.

Figura 7

Influencia de los tratamientos de biorremediación en la toxicidad aguda de suelos contaminados. Se muestran los efectos de los elutriados del suelo tras 120 h de exposición.



Nota: (A) el porcentaje de germinación, (B) el porcentaje de elongación de la radícula y (C) el porcentaje de elongación del hipocótilo, en relación con el control no contaminado. Las barras de error representan los errores estándar de las medias (n = 3). Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0{,}05$) entre los tratamientos evaluados.

En los tres tratamientos, la germinación de las semillas corresponde al parámetro más afectado, indicando que la toxicidad residual de los suelos afectó especialmente a las fases

tempranas del desarrollo vegetal. Estudios reportan que los hidrocarburos pueden interferir en la imbibición de la semilla al generar películas hidrofóbicas alrededor de la semilla, disminuyendo la disponibilidad del agua y oxígeno, alterar la permeabilidad de la membrana e inhibir el metabolismo inicial (Kamranifar et al., 2025). De igual forma, la afectación de la radícula en este estudio puede estar explicada debido a que es uno de los órganos más sensibles, corresponde a la estructura que se encuentra en contacto directo con el contaminante y con menor permeabilidad, siendo el más vulnerable en etapas tempranas. Las células presentes en este órgano se encuentran en división constante durante estas primeras etapas, lo cual las hace susceptibles a compuestos tóxicos (Haider et al., 2021). Por otro lado, el parámetro menos afectado corresponde al hipocótilo, generado por una menor exposición al contaminante y su dependencia de las reservas seminales de la semilla. Los resultados indican que la contaminación residual de los hidrocarburos afecta la absorción de agua y nutrientes de la semilla en su fase emergente, generando disminución de la biomasa celular y la fisiología de la planta, incluido la función fotosintética, por lo cual también afecta el crecimiento y la biomasa de las plántulas que lograron establecerse (Du et al., 2025).

En complemento a las pruebas de toxicidad aguda en plantas, los ensayos de mortalidad con *D. magna* mostraron resultados significativamente más bajos en el suelo tratado con el tratamiento T1 en comparación con el tratamiento T2 y el tratamiento T3, lo que indica una reducción de la toxicidad aguda de los suelos bioaumentados con el consorcio microbiano (Tabla 4). Después de 48 h, la mortalidad de *D. magna* en los suelos correspondió a suelos clasificados como no tóxicos, mientras que el tratamiento T2 y el tratamiento T3 aún se consideran suelos moderadamente tóxicos por sus valores de UTA. Los resultados de toxicidad aguda con *D. magna* son consistentes con los ensayos de toxicidad aguda con semillas de *L. sativa*, donde la toxicidad residual del suelo fue menor en el tratamiento que poseía el consorcio mixto desarrollado, seguido

del tratamiento únicamente bioestimulado, y, por último, el más contaminado correspondió al tratamiento de atenuación natural. La bioestimulación promueve la disminución de la toxicidad, pero la combinación con la bioaumentación es más efectiva para disminuir la fracción soluble o biodisponible de los contaminantes, y es consistente con estudios previos que reportan la disminución progresiva de la toxicidad de suelos que han sido biorremediados con consorcios microbianos a diferentes concentraciones del contaminante (Cardoso et al., 2020).

Tabla 4

Clasificación de la toxicidad aguda en suelos biorremediados basada en la mortalidad del organismo bioindicador Daphnia magna después de 48 horas de exposición

Tratamiento	CL_{50} a las 48 h [% (v/v)]	UTA	Clasificación de toxicidad
T1 (Bioaumentación con el consorcio y bioestimulación de la microbiota nativa)	>100	<1	Clase I – Sin toxicidad agua
T2 (Bioestimulación de la microbiota nativa)	80	1,25	Clase III – Toxicidad aguda
T3 (Atenuación natural)	40	2,5	Clase III – Toxicidad aguda

Nota: CL_{50}: concentración letal 50; UTA: unidades de toxicidad aguda.

La persistencia de toxicidad moderada en los tratamientos sin inoculación (T2 y T3) puede explicarse por la permanencia de fracciones más pesadas del petróleo, incluyendo compuestos aromáticos heterocíclicos o resinas. Estas fracciones pueden encontrarse presentes en bajas

concentraciones, sin embargo, el elutriado puede generar mayor biodisponibilidad, causando así efectos tóxicos sobre los organismos. En bioindicadores acuáticos como *D. magna*, estos compuestos tóxicos generan efectos como la narcosis no polar, la cual corresponde a la acumulación de compuestos hidrofóbicos en las membranas celulares de los organismos, causando inmovilización o incluso la mortalidad (Çelik et al., 2023). Se debe tener en cuenta que a pesar de que en el tratamiento no se observó mortalidad aguda en las condiciones evaluadas, esto no permite concluir ausencia de efectos biológicos crónicos o subletales

T1 no presentó una CL_{50} a las 48 horas evaluadas, estos resultados deben ser determinados como no efectos en la toxicidad aguda y no como una ausencia de efectos biológicos sobre los organismos evaluados. Distintos estudios demuestran que, al no obtenerse mortalidad a las 48 horas en *D. magna*, se pueden generar efectos en el crecimiento y en la reproducción en exposiciones crónicas, y un aumento en la mortalidad en la exposición por tiempo prolongado. A pesar de presentar una reducción de toxicidad aguda por parte del tratamiento bioaumentado, es necesario realizar estudios para evaluar la toxicidad crónica residual con este organismo.

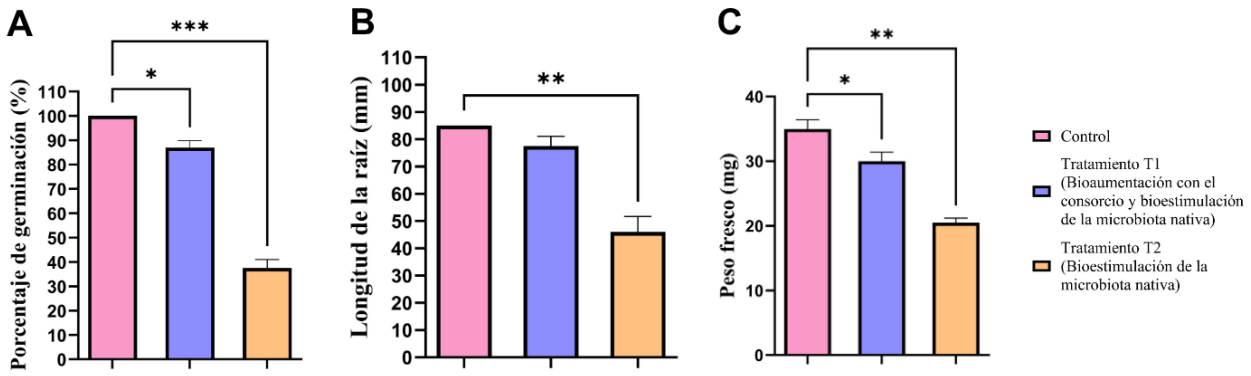
4.3.2. *Disminución de la toxicidad crónica en suelos*

Los ensayos de toxicidad crónica demostraron la efectividad de la biorremediación, donde T1 mostró la mayor reducción de la toxicidad del suelo (Figura 8). Después de 14 días, la germinación de plántulas de *L. sativa* alcanzó el 85% en el tratamiento T1 en comparación con el 40% en el tratamiento T2, mientras que los suelos sometidos a atenuación natural (el tratamiento T3) no mostraron germinación (0%), lo cual impidió la evaluación de parámetros de crecimiento adicionales. Se observaron diferencias significativas (p = 0,0007) entre el tratamiento T1 y el tratamiento T2 en elongación de la raíz (75 mm vs. 47 mm de promedio) y peso fresco de las plántulas (35 mg vs. 21 mg de promedio), sin diferencias significativas entre el tratamiento T1 y

el control no contaminado en parámetro de elongación radicular. Todo lo anterior evidencia que los hidrocarburos del petróleo afectaron el crecimiento y el desarrollo de las plantas de *L. sativa* al encontrarse en contacto directo, y que la aplicación del consorcio microbiano mixto para el proceso de biorremediación generó una disminución de las condiciones fitotóxicas después del proceso de biorremediación, recuperando la germinación y el desarrollo fisiológico de las plántulas evaluadas.

Figura 8

Influencia de los tratamientos de biorremediación en la toxicidad crónica de suelos contaminados con petróleo crudo. Se muestran los efectos en plántulas de lechuga después de 14 días de exposición.



Nota: para (A) porcentaje de germinación, (B) longitud radicular y (C) peso fresco, en relación con el control no contaminado. Las barras de error representan los errores estándar de las medias (n = 3). *indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0{,}05$) entre los tratamientos evaluados. Control: suelo no contaminado. El tratamiento T3 (atenuación natural) no se muestra debido a que no se observó germinación de las semillas (0 %).

Al comparar los tratamientos, se observó que el tratamiento T1 presentó valores más cercanos al control en términos de la germinación, el tratamiento T2 presentó una recuperación parcial del suelo y el tratamiento T3 aún presentaba signos de toxicidad elevados. Estudios anteriores han reportado la elevada sensibilidad de *L. sativa* a la contaminación de suelos por hidrocarburos, especialmente hidrocarburos aromáticos policíclicos y las fracciones más pesadas del petróleo (Zawierucha et al., 2022). Los resultados complementan los ensayos de toxicidad aguda, los cuales en conjunto indican que la adición del consorcio microbiano mixto como estrategia de biorremediación no solo redujo la toxicidad residual del petróleo crudo, sino que mejoró las condiciones del suelo para la germinación y el crecimiento inicial de *L. sativa.*

A partir de los resultados se puede determinar que la disminución de la toxicidad en los suelos se asoció con el tratamiento T1, el cual combinó las estrategias de bioaumentación y bioestimulación. Los microorganismos que conforman el consorcio microbiano han sido descritos previamente con capacidades metabólicas para la degradación de compuestos tóxicos como los hidrocarburos del petróleo, pero también han sido reportadas con características promotoras de crecimiento vegetal, con interés agrícola y de recuperación funcional del suelo. Existen reportes de cepas de *Paenibacillus cellulositrophicus* con características promotoras de crecimiento como la producción de sideróforos y enzimas hidrolíticas como actividad celulolítica, la cual permite el reciclaje de materia orgánica al usarse en conjunto como residuos lignocelulósicos como el salvado de trigo (Chukwuma et al., 2021). *Stutzerimonas stutzeri* cuenta con la capacidad fijadora de nitrógeno, solubilizadora de fosfatos y la producción del ácido indol-3-acético (AIA), ácido cianhídrico (HNC) y biopelículas, generando un aumento en la longitud de la raíz, el brote, la biomasa y la producción de pigmentos fotosintéticos en plantas (Metwally et al., 2025). *Rhodococcus qingshengii* porta genes que contribuyen a la interacción planta-microorganismo,

ayudando a la tolerancia al estrés y producción de giberelinas, además de la presencia de genes *nif* para la actividad fijadora de nitrógeno (Kuhl et al., 2021). *Cellulosimicrobium cellulans* es una bacteria productora de AIA, sideróforos, proteasas, quitinasas, amilasas y ureasa, ayudando a la fertilidad del suelo al ser capaz de colonizar la rizosfera de las plantas (Chatterjee et al., 2009; Nabti et al., 2014). *Aspergillus oryzae* tiene un papel importante en la solubilización de fosfato y producción de AIA, promoviendo el aumento de biomasa, desarrollo radicular, metabolitos y actividad enzimática antioxidante (Niaz et al., 2024). *Penicillium citrinum* es una especie productora de giberelinas y citoquinas, aumentando el crecimiento aéreo y el peso fresco de las raíces de plantas (Gu et al., 2023). En conjunto, los microorganismos que conforman el consorcio microbiano promueven la disminución de la toxicidad de los suelos a través de su capacidad degradadora de hidrocarburos y de restauración de la funcionalidad biológica de la matriz. Estas características metabólicas favorecen la biodegradación y la bioestimulación vegetal, generando la recuperación de la actividad y la fertilidad del suelo, convirtiéndose en una estrategia sostenible para la restauración integral de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

5. Conclusiones

En este estudio se desarrolló un consorcio microbiano mixto integrado por cepas de *Paenibacillus cellulositrophicus*, *Stutzerimonas stutzeri*, *Rhodococcus qingshengii*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Aspergillus oryzae* y *Penicillium citrinum*, constituyendo un consorcio estable y con potencial metabólico complementario. El consorcio mostró capacidad para utilizar petróleo crudo como única fuente de carbono y energía, tolerancia elevada frente a

hidrocarburos recalcitrantes, ausencia de interacciones antagónicas y eficiencia en la degradación frente altas concentraciones de petróleo en suelos.

La biorremediación en biopilas resultó más eficiente al combinar la bioaumentación con el consorcio mixto y la bioestimulación con salvado de trigo, alcanzando una degradación del petróleo crudo del 84,64% en tan sólo 50 días. Este proceso se acompañó de transformaciones químicas relevantes, tales como la disminución de alcanos de cadena larga e isoprenoides y aparición transitoria de ácidos grasos y ésteres, junto con elevada actividad microbiana, compatible con un proceso de transformación y oxidación de los hidrocarburos del petróleo.

La aplicación del consorcio mixto promovió una comunidad microbiana más diversa y funcionalmente complementaria, asociada a la degradación del contaminante y a los cambios fisicoquímicos en las biopilas, indicando que el tratamiento con el consorcio favorece el establecimiento de una comunidad estable, capaz de transformar hidrocarburos y contribuir a la recuperación del suelo. Los géneros *Rhodococcus*, *Aspergillus* y *Penicillium* mostraron una mayor abundancia relativa, lo cual es compatible con su persistencia bajo las condiciones evaluadas.

La aplicación del consorcio microbiano redujo significativamente la toxicidad aguda y crónica de los suelos contaminados, favoreciendo la recuperación integral de su funcionalidad, de la germinación y del crecimiento vegetal. Estos efectos se relacionan no solo con la degradación de hidrocarburos, sino también con potenciales funciones adicionales del consorcio, tales como la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno y producción de fitohormonas, que generan condiciones propicias para la restauración del suelo y el desarrollo vegetal.

Los resultados encontrados en este estudio demuestran que los procesos de biorremediación pueden ser evaluados y monitoreados de manera integral para ser enfocados en la restauración biológica y funcional de los suelos. A través de la utilización de estrategias como

bioaumentación con el consorcio microbiano desarrollado y bioestimulación con un residuo agroindustrial, se incrementó la eficiencia de degradación de los hidrocarburos del petróleo, promoviendo la actividad metabólica de los miembros del consorcio, modificando las comunidades microbianas y mejorando algunos indicadores de funcionalidad del suelo y del crecimiento vegetal. El proceso llevado a cabo a escala semipiloto permitió comprobar que el consorcio microbiano mixto es viable para aportar soluciones biotecnológicas y contribuir a la recuperación sostenible de suelos contaminados con hidrocarburos y la restauración progresiva de su actividad productiva.

6. Recomendaciones

Se recomienda evaluar y comparar diferentes métodos de extracción y cuantificación de hidrocarburos en suelos contaminados, con el propósito de mejorar la eficiencia de recuperación y la especificidad analítica, como la extracción asistida por ultrasonido o la extracción acelerada con solventes, incorporando ensayos de recuperación y controles de matriz. De igual forma, se sugiere complementar la cuantificación gravimétrica con técnicas cromatográficas, como cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), las cuales permitirían cuantificar hidrocarburos individuales o fracciones específicas del petróleo mediante estándares de calibración.

Se recomienda ampliar la identificación de intermediarios de degradación del petróleo crudo a través de técnicas que permitan detectar compuestos menos volátiles o de mayor peso molecular, tales como cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS), espectrometría de masas orbitrap con ionización por electrospray (Orbitrap ESI-MS)

y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución con analizador orbitrap (LC-Orbitrap-HRMS). De igual forma, para ver los cambios en la composición de las fracciones del petróleo se recomienda realizar ensayos de fraccionamiento SARA.

Se recomienda profundizar acerca del potencial funcional de las comunidades microbianas durante el proceso de biorremediación, con el fin de identificar genes y rutas metabólicas asociadas a degradación de hidrocarburos, tolerancia a contaminantes y recuperación de la funcionalidad biológica del suelo, a través de secuenciación masiva *shotgun*. Estos datos permitirían correlacionar los resultados y conocer a mayor detalle los mecanismos que se están llevando a cabo por los microorganismos del consorcio microbiano desarrollado durante el proceso de biorremediación.

Referencias Bibliográficas

Al Hoqani, U. H., Azmi, S. N. H., Vavolil P, J., Al Habsi, H. S., Reddy, S. H., Sah, P., Al Harthi, J. S., Bani Saad, Z. N., Al Nabhani, Z. S., Ahmed, Q. U., Mia, M. A. R., Abdelrahman, K., y Fnais, M. S. (2025). A prospective study on the biodegradation of petroleum hydrocarbons mediated by selected marine bacterial isolates. *Regional Studies in Marine Science*, *85*, 104143. https://doi.org/10.1016/J.RSMA.2025.104143

Andreu-Sánchez, Ó., García-Lorenzo, M. L., Esbrí, J. M., Sánchez-Donoso, R., Iglesias-Martínez, M., Arroyo, X., Crespo-Feo, E., Ruiz-Costa, N., Roca-Pérez, L., & Castiñeiras, P. (2022). Soil and freshwater bioassays to assess ecotoxicological impact on soils affected by mining activities in the Iberian Pyrite Belt. Toxics, 10(7), 353. https://doi.org/10.3390/toxics10070353

Antón-Herrero, R., Chicca, I., García-Delgado, C., Crognale, S., Lelli, D., Gargarello, R. M., Herrero, J., Fischer, A., Thannberger, L., Eymar, E., Petruccioli, M., y D'Annibale, A. (2023). Main Factors Determining the Scale-Up Effectiveness of Mycoremediation for the Decontamination of Aliphatic Hydrocarbons in Soil. *Journal of Fungi*, *9*(12), 1205. https://doi.org/10.3390/JOF9121205/S1

Agriroff, W. A., Carrell, A. A., Klingeman, D. M., Dove, N. C., Muchero, W., Veach, A. M., Wahl, T., Lebreux, S. J., Webb, A. B., Peyton, K., Schadt, C. W., & Cregger, M. A. (2024). Seasonality and longer-term development generate temporal dynamics in the Populus microbiome. *mSystems, 9*(3). https://doi.org/10.1128/msystems.00886-23

Arghiropol, D., Rusu, T., Moldovan, M., Paltinean, G. A., Silaghi-Dumitrescu, L., Sarosi, C., y Petean, I. (2025). Petroleum Hydrocarbon Pollution and Sustainable Uses of Indigene

Absorbents for Spill Removal from the Environment—A Review. *Sustainability*, *17*(17), 8018. https://doi.org/10.3390/SU17178018

Asemoloye, M. D., Tosi, S., Daccò, C., Wang, X., Xu, S., Marchisio, M. A., Gao, W., Jonathan, S. G., y Pecoraro, L. (2020). Hydrocarbon Degradation and Enzyme Activities of Aspergillus oryzae and Mucor irregularis Isolated from Nigerian Crude Oil-Polluted Sites. *Microorganisms,* *8*(12), 1912. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8121912

ASTM International. (2022). Standard test method for determination of asphaltenes (heptane insolubles) in crude petroleum and petroleum products (ASTM D6560-22). ASTM International.

Atakpa, E. O., Zhou, H., Jiang, L., Ma, Y., Liang, Y., Li, Y., Zhang, D., y Zhang, C. (2022). Improved degradation of petroleum hydrocarbons by co-culture of fungi and biosurfactant-producing bacteria. *Chemosphere*, *290*, 133337. https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.133337

Bala, S., Garg, D., Thirumalesh, B. V., Sharma, M., Sridhar, K., Inbaraj, B. S., & Tripathi, M. (2022). Recent Strategies for Bioremediation of Emerging Pollutants: A Review for a Green and Sustainable Environment. *Toxics*, *10*(8), 484. https://doi.org/10.3390/TOXICS10080484

Barrera, M. S., Marín, C., Cortés-Espinosa, D. V., y Zafra, G. (2026). Asphaltene biodegradation and transcriptome responses of hydrocarbon degradation genes in soil by a novel tolerant fungal consortium. *Environmental Science and Pollution Research 2026*, 1–14. https://doi.org/10.1007/s11356-026-37580-8

Bishnoi, K., Rani, P., Karwal, M., y Bishnoi, N. R. (2024). PAHs Biodegradation by Locally Isolated Phanerochaete chrysosporium and Penicillium citrinum from Liquid and Spiked Soil. *Nature Environment and Pollution Technology*, *23*(2), 785–795. https://doi.org/10.46488/NEPT.2024.V23I02.015

Boddy, L., y Hiscox, J. (2016). Fungal Ecology: Principles and Mechanisms of Colonization and Competition by Saprotrophic Fungi. *Microbiology Spectrum*, *4*(6). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0019-2016

Brzeszcz, J., Steliga, T., Ryszka, P., Kaszycki, P., y Kapusta, P. (2023). Bacteria degrading both n-alkanes and aromatic hydrocarbons are prevalent in soils. *Environmental Science and Pollution Research, 31*(4), 5668–5683. https://doi.org/10.1007/S11356-023-31405-8

Cabral, L., Giovanella, P., Pellizzer, E. P., Teramoto, E. H., Kiang, C. H., y Sette, L. D. (2022). Microbial communities in petroleum-contaminated sites: Structure and metabolisms. *Chemosphere*, *286*, 131752. https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.131752

Cardoso, D. N., Soares, A. M. V. M., Wrona, F. J., y Loureiro, S. (2020). Assessing the acute and chronic toxicity of exposure to naturally occurring oil sands deposits to aquatic organisms using Daphnia magna. *Science of The Total Environment*, *729*, 138805. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.138805

Çelik, G., Stolte, S., y Markiewicz, M. (2023). NSO-heterocyclic PAHs – Controlled exposure study reveals high acute aquatic toxicity. *Journal of Hazardous Materials*, *460*, 132428. https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2023.132428

Chatterjee, S., Sau, G. B., y Mukherjee, S. K. (2009). Plant growth promotion by a hexavalent chromium reducing bacterial strain, Cellulosimicrobium cellulans KUCr3. *World*

Journal of Microbiology and Biotechnology, *25*(10), 1829–1836. https://doi.org/10.1007/S11274-009-0084-5

Choi, B., Yu, J.-S., Kang, G.-Y., Jeong, T.-Y., Jho, E. H., y Lee, S.-J. (2022). Pyrolytic Remediation and Ecotoxicity Assessment of Fuel-Oil-Contaminated Soil. *Toxics*, *10*(5), 245. https://doi.org/10.3390/TOXICS10050245

Chukwuma, O. B., Rafatullah, M., Tajarudine, H. A., y Ismail, N. (2021). A Review on Bacterial Contribution to Lignocellulose Breakdown into Useful Bio-Products. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(11), 6001. https://doi.org/10.3390/IJERPH18116001

Curry, K. D., Wang, Q., Nute, M. G., Tyshaieva, A., Reeves, E., Soriano, S., Wu, Q., Graeber, E., Finzer, P., Mendling, W., Savidge, T., Villapol, S., Dilthey, A., y Treangen, T. J. (2022). Emu: species-level microbial community profiling of full-length 16S rRNA Oxford Nanopore sequencing data. *Nature Methods, 19*(7), 845–853. https://doi.org/10.1038/s41592-022-01520-4

Daâssi, D., y Qabil Almaghribi, F. (2022). Petroleum-contaminated soil: environmental occurrence and remediation strategies. *3 Biotech, 12*(6), 139-. https://doi.org/10.1007/S13205-022-03198-Z

Dai, X., Lv, J., Wei, W., y Guo, S. (2021). Effects of adding laccase to bacterial consortia degrading heavy oil. *Processes*, *9*(11). https://doi.org/10.3390/pr9112025

Dhar, K., Panneerselvan, L., Venkateswarlu, K., y Megharaj, M. (2022). Efficient bioremediation of PAHs-contaminated soils by a methylotrophic enrichment culture. *Biodegradation*, *33*(6), 575–591. https://doi.org/10.1007/s10532-022-09996-9

Diogo, B. S., Narayan, A., Mansilha, C., Marques, J. E., Flores, D., y Antunes, S. C. (2023). Phytotoxicity of coal waste elutriates (Douro Coalfield, North Portugal) in Lactuca sativa. *Environmental Science and Pollution Research, 30*(49), 107650–107660. https://doi.org/10.1007/S11356-023-29868-W

Du, X., Sun, W., Liu, X., Chi, Z., Sheng, H., y Liu, F. (2025). Comprehensive Ecotoxicity of the Complex System of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Sites to Wheat (Triticum aestivum L.) During Microbial Remediation. *Sustainability (Switzerland)*, *17*(9), 4127. https://doi.org/10.3390/SU17094127/S1

Ecopetrol S.A. (2025). *Comportamiento histórico de incidentes*. Vicepresidencia Corporativa De Transformación Territorial Y HSE. https://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/Home/sostecnibilidad/ambiental/prevencion-remediacion/historico-incidentes

Elshafei, A. M., y Mansour, R. (2024). Microbial bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons. *Discover Soil, 1*(1), 9-. https://doi.org/10.1007/S44378-024-00004-5

Espinosa-Ortiz, E. J., Rene, E. R., y Gerlach, R. (2022). Potential use of fungal-bacterial co-cultures for the removal of organic pollutants. *Critical Reviews in Biotechnology*, *42*(3), 361–383. https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1940831

Fallahi, M., Sarempour, M., y Mirzadi Gohari, A. (2023). Potential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and petroleum hydrocarbons by indigenous fungi recovered from crude oil-contaminated soil in Iran. *Scientific Reports*, *13*(1), 22153-. https://doi.org/10.1038/s41598-023-49630-z

Gallego, J. L. R., Peña-Álvarez, V., Lara, L. M., Baragaño, D., Forján, R., Colina, A., Prosenkov, A., & Peláez, A. I. (2022). Effective bioremediation of soil from the Burgan oil field (Kuwait) using compost: A comprehensive hydrocarbon and DNA fingerprinting study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 247, 114267. https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2022.114267

Gao, H., Wu, M., Liu, H., Xu, Y., y Liu, Z. (2022). Effect of petroleum hydrocarbon pollution levels on the soil microecosystem and ecological function. *Environmental Pollution*, *293*, 118511. https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.118511

Gargouri, B., Mhiri, N., Karray, F., Aloui, F., y Sayadi, S. (2015). Isolation and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Yeast Strains from Petroleum Contaminated Industrial Wastewater. *BioMed Research International*, *2015*(1), 929424. https://doi.org/10.1155/2015/929424

Germaine, K. J., Byrne, J., Liu, X., Keohane, J., Culhane, J., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Ryan, D., y Dowling, D. N. (2015). Ecopiling: A combined phytoremediation and passive biopiling system for remediating hydrocarbon impacted soils at field scale. *Frontiers in Plant Science*, *5*(JAN), 126740. https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00756

Gómez Giraldo, J. C. (2013). Manual de prácticas de campo y del laboratorio de suelos. Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). https://repositorio.sena.edu.co/handle/11404/2785

Gu, K., Chen, C. Y., Selvaraj, P., Pavagadhi, S., Yeap, Y. T., Swarup, S., Zheng, W., y Naqvi, N. I. (2023). Penicillium citrinum Provides Transkingdom Growth Benefits in Choy Sum (Brassica rapa var. parachinensis). *Journal of Fungi*, *9*(4), 420. https://doi.org/10.3390/JOF9040420/S1

Guo, X., Zhang, J., Han, L., Lee, J., Williams, S. C., Forsberg, A., Xu, Y., Austin, R. N., y Feng, L. (2023). Structure and mechanism of the alkane-oxidizing enzyme AlkB. *Nature Communications, 14*(1), 2180-. https://doi.org/10.1038/s41467-023-37869-z

Haghollahi, A., Fazaelipoor, M. H., y Schaffie, M. (2016). The effect of soil type on the bioremediation of petroleum contaminated soils. *Journal of Environmental Management*, *180*, 197–201. https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2016.05.038

Haider, F. U., Ejaz, M., Cheema, S. A., Khan, M. I., Zhao, B., Liqun, C., Salim, M. A., Naveed, M., Khan, N., Núñez-Delgado, A., y Mustafa, A. (2021). Phytotoxicity of petroleum hydrocarbons: Sources, impacts and remediation strategies. *Environmental Research*, *197*, 111031. https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2021.111031

Helmy, Q., y Kardena, E. (2024). Enhancing field-scale bioremediation of weathered petroleum oil-contaminated soil with biocompost as a bulking agent. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, *9*, 100735. https://doi.org/10.1016/J.CSCEE.2024.100735

Iminova, L., Delegan, Y., Frantsuzova, E., Bogun, A., Zvonarev, A., Suzina, N., Anbumani, S., y Solyanikova, I. (2022). Physiological and biochemical characterization and genome analysis of Rhodococcus qingshengii strain 7B capable of crude oil degradation and plant stimulation. *Biotechnology Reports*, *35*, e00741. https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2022.E00741

Jayaramaiah, R. H., Egidi, E., Macdonald, C. A., Wang, J. T., Jeffries, T. C., Megharaj, M., y Singh, B. K. (2022). Soil initial bacterial diversity and nutrient availability determine the rate of xenobiotic biodegradation. *Microbial Biotechnology*, *15*(1), 318–336. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13946

Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., y Bartlam, M. (2013). Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 42005. https://doi.org/10.3389/FMICB.2013.00058

Kamranifar, M., Pourzamani, H., Khosravi, R., Ranjbar, G., y Ebrahimpour, K. (2025). Phytotoxic effects of petroleum hydrocarbons on germination and growth of the native halophyte Salicornia sinus persica in oil contaminated soil. *Scientific Reports*, *15*(1), 8459-. https://doi.org/10.1038/s41598-025-92512-9

Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F. S., Bahram, M., Bates, S. T., Bruns, T. D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T. M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G. W., Hartmann, M., Kirk, P. M., Kohout, P., y Larsson, K. H. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, *22*(21), 5271–5277. https://doi.org/10.1111/MEC.12481

Kristensen, M., Johnsen, A. R., y Christensen, J. H. (2021). Super-complex mixtures of aliphatic- and aromatic acids may be common degradation products after marine oil spills: A lab-study of microbial oil degradation in a warm, pre-exposed marine environment. *Environmental Pollution*, *285*, 117264. https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.117264

Kuhl, T., Chowdhury, S. P., Uhl, J., y Rothballer, M. (2021). Genome-Based Characterization of Plant-Associated Rhodococcus qingshengii RL1 Reveals Stress Tolerance and Plant–Microbe Interaction Traits. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 708605. https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.708605

Kulkarni, A. D., Khurpade, P. D., y Nandi, S. (2024). Estimation of SARA composition of crudes purely from density and viscosity using machine learning based models. *Petroleum*, *10*(4), 620–630. https://doi.org/10.1016/J.PETLM.2024.06.001

Kumar, V., Kumar, H., Vishal, V., y Lal, S. (2023). Studies on the morphology, phylogeny, and bioremediation potential of Penicillium citrinum and Paecilomyces variotii (Eurotiales) from oil-contaminated areas. *Archives of Microbiology*, *205*(1), 50-. https://doi.org/10.1007/S00203-022-03383-X

Kuppan, N., Padman, M., Mahadeva, M., Srinivasan, S., y Devarajan, R. (2024). A comprehensive review of sustainable bioremediation techniques: Eco friendly solutions for waste and pollution management. *Waste Management Bulletin*, *2*(3), 154–171. https://doi.org/10.1016/J.WMB.2024.07.005

Lázaro-Mass, S., Gómez-Cornelio, S., Castillo-Vidal, M., Alvarez-Villagomez, C. S., Quintana, P., y De la Rosa-García, S. (2023). Biodegradation of hydrocarbons from contaminated soils by microbial consortia: A laboratory microcosm study. *Electronic Journal of Biotechnology*, *61*, 24–32. https://doi.org/10.1016/J.EJBT.2022.10.002

Li, H. (2021). New strategies to improve minimap2 alignment accuracy. *Bioinformatics*, *37*(23), 4572–4574. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTAB705

Linder, G., Greene, J. C., Ratsch, H., Nwosu, J., Smith, S., y Wilborn, D. (1990). Seed Germination and Root Elongation Toxicity Tests in Hazardous Waste Site Evaluation: Methods Development and Applications. *ASTM Special Technical Publication*, (1091), 177–187. https://doi.org/10.1520/STP19062S

Liu, P. F., Yang, Z. H., Chen, Y. L., Lo, K. H., y Kao, C. M. (2021). Remediation of weathered diesel-oil contaminated soils using biopile systems: An amendment selection and pilot-

scale study. *Science of The Total Environment*, *786*, 147395. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.147395

Liu, Z., Wang, X., Zheng, G., Li, J., Qin, J., Wang, L., Ouyang, X., Wang, J., y Gu, W. (2025). Effects of petroleum contamination on soil metal(loid)s and microbial communities. *Journal of Environmental Sciences*, *157*, 662–673. https://doi.org/10.1016/J.JES.2024.12.008

Lu, Y., Zhou, G., Ewald, J., Pang, Z., Shiri, T., y Xia, J. (2023). MicrobiomeAnalyst 2.0: comprehensive statistical, functional and integrative analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Research*, *51*(W1), W310–W318. https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD407

Madhaiyan, M., Selvakumar, G., Alex, T. H. H., Cai, L., y Ji, L. (2021). Plant Growth Promoting Abilities of Novel Burkholderia-Related Genera and Their Interactions With Some Economically Important Tree Species. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *5*, 618305. https://doi.org/10.3389/FSUFS.2021.618305

Martínez-Cuesta, R., Conlon, R., Wang, M., Blanco-Romero, E., Durán, D., Redondo-Nieto, M., Dowling, D., Garrido-Sanz, D., Martin, M., Germaine, K., y Rivilla, R. (2023). Field scale biodegradation of total petroleum hydrocarbons and soil restoration by Ecopiles: microbiological analysis of the process. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1158130. https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1158130

Mayans, B., Antón-Herrero, R., García-Delgado, C., Delgado-Moreno, L., Guirado, M., Pérez-Esteban, J., Escolástico, C., y Eymar, E. (2024). Bioremediation of petroleum hydrocarbons polluted soil by spent mushroom substrates: Microbiological structure and

functionality. *Journal of Hazardous Materials*, *473*, 134650. https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2024.134650

Mekonnen, B. A., Aragaw, T. A., y Genet, M. B. (2024). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: a review on principles, degradation mechanisms, and advancements. *Frontiers in Environmental Science*, *12*, 1354422. https://doi.org/10.3389/FENVS.2024.1354422

Metwally, S. M., El-Sapagh, S., Ali, S. S., Sun, J., Schagerl, M., y Elsherif, D. E. (2025). Rhizosphere-derived Stutzerimonas stutzeri AUMC B-503: a promising biocontrol and plant growth-promoting strain for managing brown spot disease in rice (Oryza sativa). *Frontiers in Plant Science*, *16*, 1700440. https://doi.org/10.3389/FPLS.2025.1700440

Montaño Moreno, S. (2015). *Escalamiento piloto de un sistema de biorremediación por bioaumentación y bioestimulación de suelo contaminado con diésel*. Instituto Politécnico Nacional.

Müller, F., Wang, H., Reinhard, A., Omirbekova, A., Berzhanova, R., Mukasheva, T., Urich, T., y Mikolasch, A. (2026). The hydrocarbon-degrading bacteria and fungi in oil contaminated soils of Kazakhstan: microbiome composition, enrichment, isolation and bioremediation potential. *Environmental Microbiome, 21*(1), 49-. https://doi.org/10.1186/S40793-026-00866-Y

Nabti, E., Bensidhoum, L., Tabli, N., Dahel, D., Weiss, A., Rothballer, M., Schmid, M., y Hartmann, A. (2014). Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a Cellulosimicrobium sp. strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in northwestern Algeria. *European Journal of Soil Biology*, *61*, 20–26. https://doi.org/10.1016/J.EJSOBI.2013.12.008

Navas-Cáceres, O. D., Parada, M., y Zafra, G. (2023). Development of a highly tolerant bacterial consortium for asphaltene biodegradation in soils. *Environmental Science and Pollution Research, 30*(59), 123439–123451. https://doi.org/10.1007/s11356-023-30682-7

Niaz, K., Rauf, M., Arif, M., Hamayun, M., Gul, H., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., y Wu, Q. S. (2024). Drought-tolerant fungal microbes, Aspergillus oryzae and Aspergillus fumigatus, elevate physiohormonal and antioxidant responses of maize under drought stress. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1488639. https://doi.org/10.3389/FMICB.2024.1488639

Nji, Q. N., Babalola, O. O., y Mwanza, M. (2023). Soil Aspergillus Species, Pathogenicity and Control Perspectives. *Journal of Fungi, 9*(7), 766. https://doi.org/10.3390/JOF9070766

Nkem, B. M., Halimoon, N., Yusoff, F. M., Johari, W. L. W., Zakaria, M. P., Medipally, S. R., y Kannan, N. (2016). Isolation, identification and diesel-oil biodegradation capacities of indigenous hydrocarbon-degrading strains of Cellulosimicrobium cellulans and Acinetobacter baumannii from tarball at Terengganu beach, Malaysia. *Marine Pollution Bulletin*, *107*(1), 261–268. https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2016.03.060

Nzila, A., y Musa, M. M. (2021). Current Knowledge and Future Challenges on Bacterial Degradation of the Highly Complex Petroleum Products Asphaltenes and Resins. *Frontiers in Environmental Science*, *9*, 779644. https://doi.org/10.3389/FENVS.2021.779644

Organisation for Economic Co-operation and Development. (2004). Test No. 202: Daphnia sp. acute immobilisation test (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2). OECD Publishing. https://doi.org/10.1787/9789264069947-en

Omenna, E. C., Omage, K., y Azeke, M. A. (2025). Alkaline pH and enhanced catalase activity improve the in vitro bio-remediation of crude-oil polluted soil. *Scientific Reports 2025, 15*(1), 37444-. https://doi.org/10.1038/s41598-025-21353-3

Ostovar, M., Muñana, S., Galdames, A., Berganza, J., Orueta, M., Esteban, J. J., Brettes, P., Vilela, J. L. V., y Rubio, L. R. (2025). Advancements in biopile-based sustainable soil remediation: a decade of improvements, integrating bioremediation technologies and AI-based innovative tools. *Environmental Science and Pollution Research*, *32*(40), 22766–22793. https://doi.org/10.1007/S11356-025-37002-1

Ou, Y., Zhang, C., Wu, M., Yu, Y., Zhang, X., Hu, M., Gao, H., y Wu, X. (2025). Differential roles of nitrogen and phosphorus in petroleum hydrocarbon biodegradation: Metatranscriptomic insights from soil bioremediation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *13*(5), 118412. https://doi.org/10.1016/J.JECE.2025.118412

Parthipan, P., Elumalai, P., Sathishkumar, K., Sabarinathan, D., Murugan, K., Benelli, G., y Rajasekar, A. (2017). Biosurfactant and enzyme mediated crude oil degradation by Pseudomonas stutzeri NA3 and Acinetobacter baumannii MN3. *3 Biotech 2017*, *7*(5), 278-. https://doi.org/10.1007/S13205-017-0902-7

Plaza, G., Ulfig, K., Worsztynowicz, A., Malina, G., Krzeminska, B., y Brigmon, R. L. (2005). Respirometry for Assessing the Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons. *Environmental Technology*, *26*(2), 161–170. https://doi.org/10.1080/09593332608618569

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., y Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing

and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D590–D596. https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1219

R Core Team. (2026). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. https://www.R-project.org/

Raganati, F., Markou, G., De, C. E., Silva, F., y Alaidaroos, B. A. (2023). Advancing Eco-Sustainable Bioremediation for Hydrocarbon Contaminants: Challenges and Solutions. *Processes, 11*(10), 3036. https://doi.org/10.3390/PR11103036

Rezaei, Z., y Moghimi, H. (2024). Fungal-bacterial consortia: A promising strategy for the removal of petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *280*, 116543. https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2024.116543

Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria: Minireview. *Environmental Microbiology*, *11*(10), 2477–2490. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x

Silva Monteiro, J. P., da Silva, A. F., Delgado Duarte, R. T., y José Giachini, A. (2024). Exploring Novel Fungal–Bacterial Consortia for Enhanced Petroleum Hydrocarbon Degradation. *Toxics*, *12*(12), 913. https://doi.org/10.3390/TOXICS12120913/S1

Sosulski, T., Wierzchowska, W., Stępień, W., y Szymańska, M. (2025). Biochar Derived from Agro-Industrial Waste: Applications in Agricultural and Environmental Applications. *Agronomy, 15*(5), 1087. https://doi.org/10.3390/AGRONOMY15051087

Fernández-Linares, L. C., Rojas-Avellizapa, N. G., Roldán-Carrillo, T. G., Ramírez-Islas, M. E., Zegarra-Martínez, H. G., Uribe-Hernández, R., & Arce-Ortega, J. M. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo; Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; Instituto Nacional de Ecología.

Stepanova, A. Y.;, Gladkov, E. A.;, Osipova, E. S.;, Gladkova, O. V.;, Fernandes-Júnior, P. I., Stepanova, A. Y., Gladkov, A., Osipova, E. S., Gladkova, O. V., & Tereshonok, D. V. (2022). Bioremediation of Soil from Petroleum Contamination. *Processes*, *10*(6), 1224. https://doi.org/10.3390/PR10061224

Tesfaye, E. L., Bogale, F. M., y Aragaw, T. A. (2025). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: The role of ligninolytic enzymes and advances of biosensors for in-situ monitoring. *Emerging Contaminants*, *11*(1), 100424. https://doi.org/10.1016/J.EMCON.2024.100424

Tsai, W. H., Chen, T. W., Liu, Y. H., Shen, S. M., Chen, C. S., y Tien, C. J. (2025). A field-scale assessment of the efficacy of bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils using two biostimulants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *196*, 105942. https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2024.105942

Udume, O. A., Abu, G. O., Stanley, H. O., Vincent-Akpu, I. F., Momoh, Y., y Eze, M. O. (2023). Biostimulation of Petroleum-Contaminated Soil Using Organic and Inorganic Amendments. *Plants, 12*(3), 431. https://doi.org/10.3390/PLANTS12030431

U.S. Environmental Protection Agency. (1988). Protocols for short-term toxicity screening of hazardous waste sites (EPA/600/3-88/029). Environmental Research Laboratory. https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=2000HUXX.TXT

Vanhee, M., Floré, K., Vanthourenhout, S., Hellemans, J., Muyldermans, A., y Reynders, M. (2024). Implementation of full-length 16S nanopore sequencing for bacterial identification in a clinical diagnostic setting. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *108*(2), 116156. https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2023.116156

Varjani, S., y Upasani, V. N. (2019). Influence of abiotic factors, natural attenuation, bioaugmentation and nutrient supplementation on bioremediation of petroleum crude contaminated agricultural soil. *Journal of Environmental Management*, *245*, 358–366. https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2019.05.070

Vecchiato, M., Bonato, T., Bertin, A., Argiriadis, E., Barbante, C., y Piazza, R. (2017). Plant Residues as Direct and Indirect Sources of Hydrocarbons in Soils: Current Issues and Legal Implications. *Environmental Science and Technology Letters*, *4*(12), 512–517. https://doi.org/10.1021/ACS.ESTLETT.7B00464

Wang, M., Dowling, D. N., y Germaine, K. J. (2025). Bioremediation of Diesel-Contaminated Soil: Hydrocarbon Degradation and Soil Toxicity Reduction by Constructed Bacterial Consortia. *Applied Sciences (Switzerland)*, *15*(18), 10143. https://doi.org/10.3390/APP151810143/S1

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990). AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In *PCR Protocols* (315–322). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

Wu, B., Xiu, J., Yu, L., Huang, L., Yi, L., y Ma, Y. (2023). Degradation of crude oil in a co-culture system of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in Microbiology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1132831

Wu, L., Wang, J., Jin, T., Zhou, X., y Wang, L. (2025). Lignin-enhanced fungal-bacterial consortium for degradation of petroleum hydrocarbon contaminants. *Journal of Environmental Management*, *388*, 125973. https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2025.125973

Wu, M., Feng, S., Liu, Z., y Tang, S. (2024). Bioremediation of petroleum-contaminated soil based on both toxicity risk control and hydrocarbon removal—progress and prospect. *Environmental Science and Pollution Research, 31*(50), 59795–59818. https://doi.org/10.1007/S11356-024-34614-X

Wu, M., Wu, J., Zhang, X., y Ye, X. (2019). Effect of bioaugmentation and biostimulation on hydrocarbon degradation and microbial community composition in petroleum-contaminated loessal soil. *Chemosphere*, *237*, 124456. https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.124456

Yang, X., Yu, H., Ren, J., Cai, L., Xu, L., y Liu, L. (2023). Sulfoxide-Containing Bisabolane Sesquiterpenoids with Antimicrobial and Nematicidal Activities from the Marine-Derived Fungus Aspergillus sydowii LW09. *Journal of Fungi*, *9*(3), 347. https://doi.org/10.3390/JOF9030347/S1

Yehia, R. S. (2023). Highlighting the potential for crude oil bioremediation of locally isolated Cunninghamella echinulata and Mucor circinelloides. *Brazilian Journal of Microbiology*, *54*(3), 1969–1981. https://doi.org/10.1007/s42770-023-01008-z

Yessentayeva, K., Reinhard, A., Berzhanova, R., Mukasheva, T., Urich, T., y Mikolasch, A. (2024). Bacterial crude oil and polyaromatic hydrocarbon degraders from Kazakh oil fields as barley growth support. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *108*(1). https://doi.org/10.1007/s00253-024-13010-y

Yürümez Canpolat, E., y Artan Onat, T. (2025). The Effect of Carbon Sources on Carotenoid Synthesis by the Novel Rhodococcus corynebacterioides TAO1. *Fermentation, 11*(10), 599. https://doi.org/10.3390/FERMENTATION11100599

Zafra, G., Absalón, Á. E., Anducho-Reyes, M. Á., Fernandez, F. J., y Cortés-Espinosa, D. V. (2017). Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. *Chemosphere*, *172*, 120–126. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.038

Zargar, A. N., Kumar, A., Sinha, A., Kumar, M., Skiadas, I., Mishra, S., & Srivastava, P. (2021). Asphaltene biotransformation for heavy oil upgradation. *AMB Express*, 11(1). https://doi.org/10.1186/s13568-021-01285-7

Zawierucha, I., Malina, G., Herman, B., Rychter, P., Biczak, R., Pawlowska, B., Bandurska, K., y Barczynska, R. (2022). Ecotoxicity and bioremediation potential assessment of soil from oil refinery station area. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, *20*(1), 337–346. https://doi.org/10.1007/S40201-021-00780-0/FIGURES/4

Zhang, T., y Zhang, H. (2022). Microbial Consortia Are Needed to Degrade Soil Pollutants. *Microorganisms, 10*(2), 261. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10020261

Zhou, G., Wang, M., Zhu, H., Wang, J., y Zhang, S. (2025). Effects of organic carbon, inorganic phosphorus, and phosphorus-solubilizing bacteria on maize growth, nutrient uptake, and rhizosphere phosphorus availability. *Frontiers in Plant Science*, *16*, 1644448. https://doi.org/10.3389/FPLS.2025.1644448

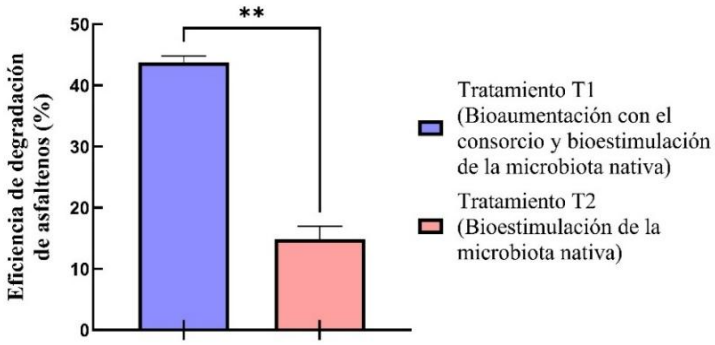
Zhuang, J., Zhang, R., Zeng, Y., Dai, T., Ye, Z., Gao, Q., Yang, Y., Guo, X., Li, G., y Zhou, J. (2023). Petroleum pollution changes microbial diversity and network complexity of soil profile in an oil refinery. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1193189. https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1193189

Apéndices

Apéndice A. *Ensayo de degradación a escala de microcosmos a partir de un consorcio fúngico altamente tolerante.*

Las cepas *Aspergillus sydowii* H1, *Aspergillus oryzae* H3 y *Penicillium citrinum* H10 no presentaron relaciones antagónicas entre sí, permitiendo desarrollar un consorcio fúngico altamente tolerante. Se llevó a cabo un ensayo de degradación a nivel de microcosmos para evaluar la capacidad del consorcio para degradar hidrocarburos pesados, específicamente asfaltenos. Los resultados demostraron que después de los 30 días del ensayo, el tratamiento T1, el cual correspondía al bioaumentado con el consorcio fúngico y bioestimulado con el bagazo de caña, obtuvo la mayor eficiencia de degradación, alcanzando hasta un 43,70%. Este porcentaje fue significativamente mayor (p = 0,0034) que el observado en el tratamiento únicamente bioestimulado con bagazo de caña (tratamiento T2), el cual solo alcanzó una eficiencia de degradación del 14,89%.

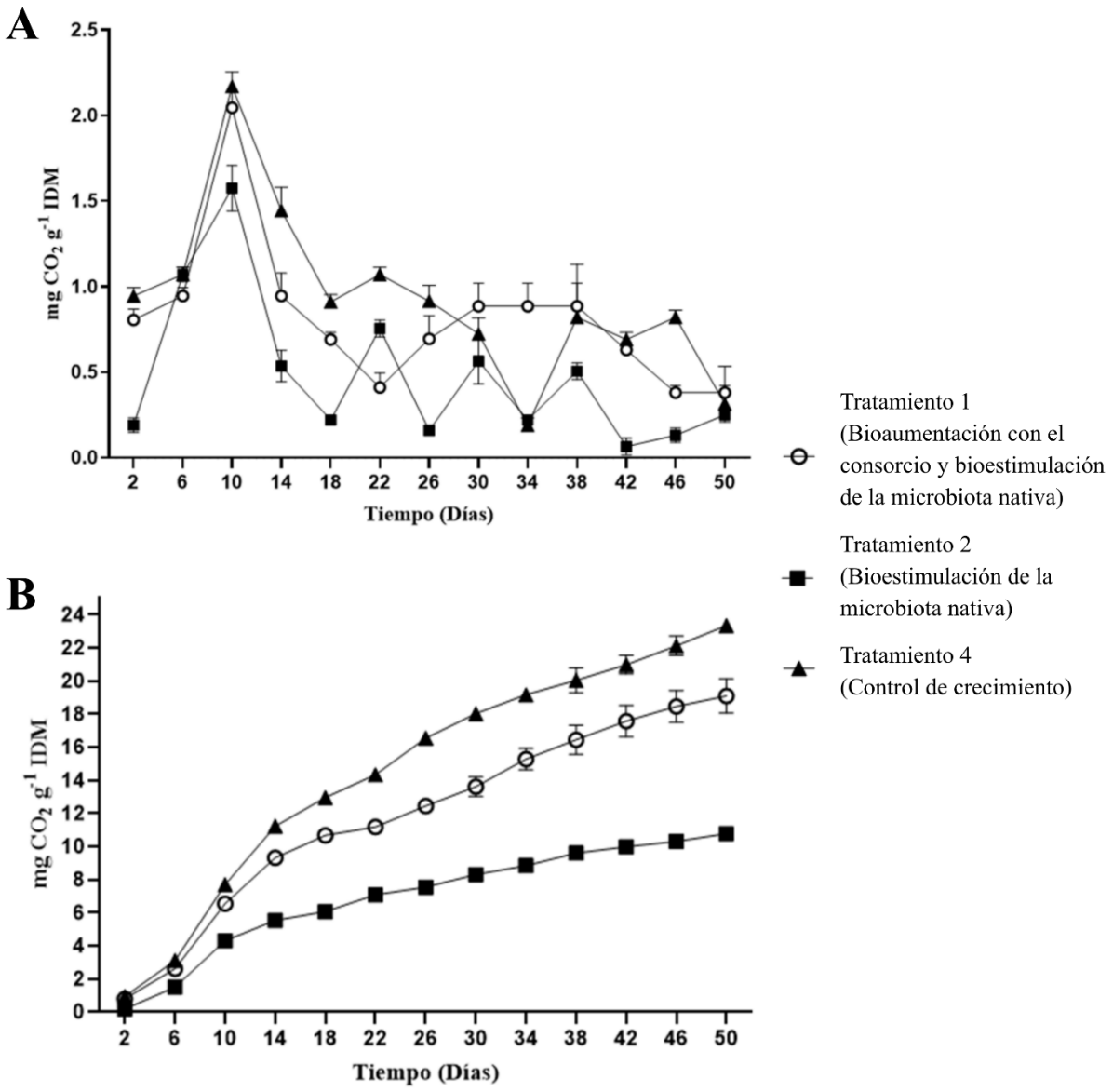
*Degradación de asfaltenos en suelos contaminado con 5.000 mg por kg de suelo tras un ensayo de biorremediación en microcosmos de 30 días. La eficiencia de degradación presenta diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento T1 y tratamiento T2. Las barras de error representan los errores estándar de las medias (n = 2). ** p = 0,0034.*



Apéndice B. *Medición de producción de CO_2 en los microcosmos durante el ensayo de degradación de 50 días.*

La medición de la producción de CO_2 se realizó cada 48 horas en cada uno de los biorreactores como una medida indirecta de la actividad metabólica y del crecimiento microbiano durante el proceso de degradación. La medición se realizó a partir de un sistema de aireación que consistía en una bomba de aire acoplada a una trampa de KOH 9% para la captura del CO2 ambiental, una trampa de agua estéril y un filtro de 0,22 μm para garantizar la esterilidad del sistema. El CO_2 obtenido de cada reactor se capturó en NaOH 0,2 N y se precipitó con BaCl 2%. El exceso de NaOH que no reacción con la sal de bario se tituló utilizando HCl 0,2 N, donde la cantidad de CO_2 producido en cada biorreactor durante el metabolismo microbiano, fue inversamente proporcional al volumen de HCl gastado en la titulación ácido-base.

Apéndice C. *Producción de CO_2 del consorcio microbiano mixto en los microcosmos durante el ensayo de degradación de 50 días.*



Nota: (A): Producción de CO_2 instantánea durante 50 días. (B): Producción de CO_2 acumulada durante 50 días.

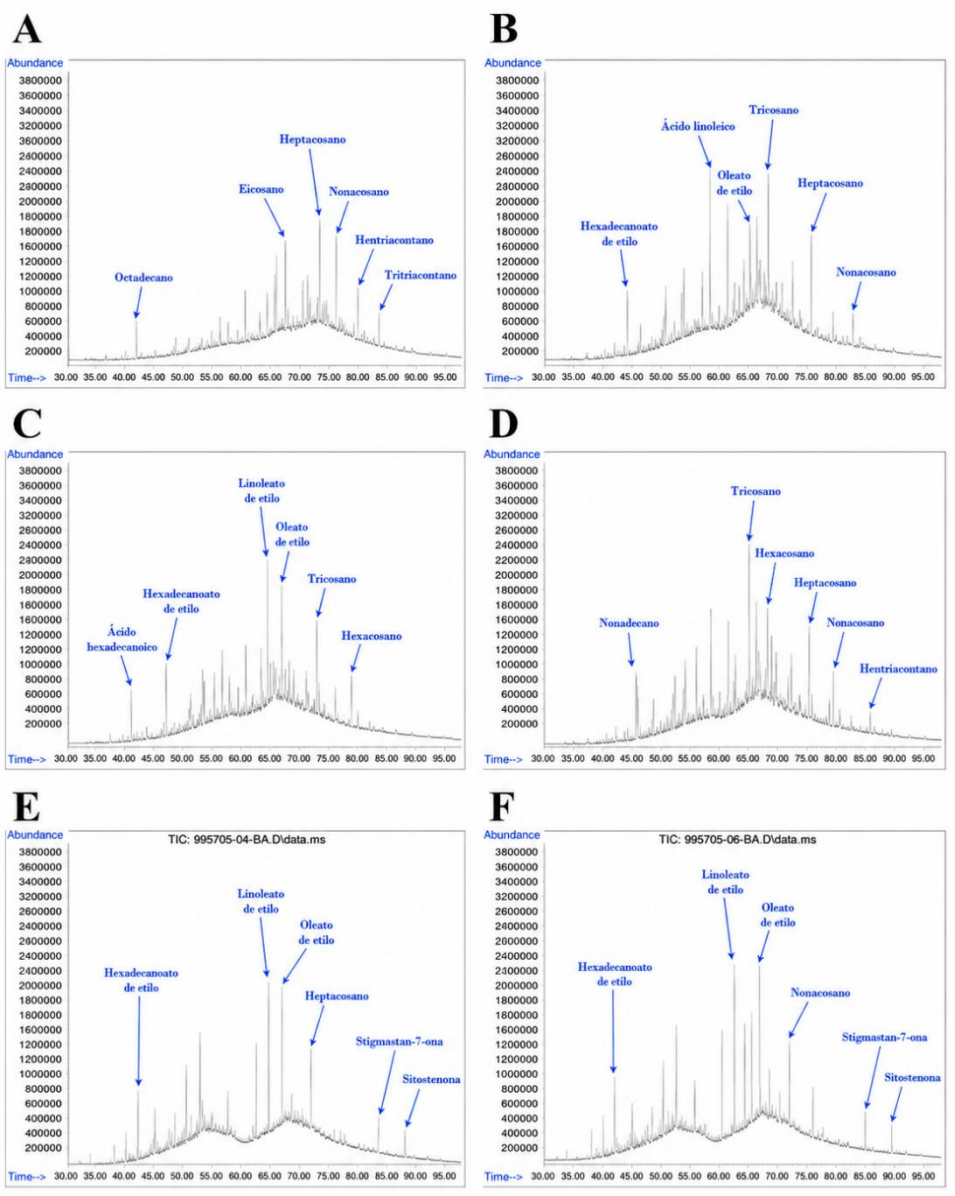
Apéndice D. *Clasificación de compuestos detectados por GC-MS según complejidad a lo largo del proceso de biorremediación en cada uno de los tratamientos.*

		Cantidad relativa por muestra (%)									
		Antes del tratamiento		T1					T2	T3	Cont.
Grupo funcional	Compuesto	Suelo contaminado	Suelo no contaminado	Día 10	Día 20	Día 30	Día 40	Día 50	Día 50	Día 50	Día 50
Alcano lineal	Hexadecano	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-
	Heptadecano	1,6	-	2,3	2	-	-	1,1	1,4	1,5	-
	Octadecano	3,4	8,3	3,1	4,4	3,6	2,9	3,4	3,8	4,1	-
	Eicosano	5,8	10,7	4,4	6,9	8,3	6,9	6,3	6,8	6	6,2
	Heneicosano	5,4	-	3,9	5,9	6,9	6	5,8	6	6	6,3
	Docosano	6,2	-	4,1	6,1	7,3	6,6	6,5	6,5	6,9	9,3
	Tricosano	7,1	-	4,3	6,2	9,1	8,5	8,2	7,7	6,2	12,5
	Tetracosano	7,2	-	4,7	6,3	7,9	7,2	7,2	7,5	5,8	10,4
	Pentacosano	7	-	4,4	5,9	7,3	6,7	6,7	7,1	5,9	11,1
	Hexacosano	8	-	4,6	6,4	7,3	6,5	6,7	7,4	5,6	10
	Heptacosano	8,3	10,5	4,5	5,9	7,5	6,6	7	7,3	4,4	9,4
	Octacosano	6,3	-	3,5	4,1	6,2	5,3	4,8	5	3,8	7,5
	Triacontano	5,2	-	2,7	2,7	3,4	3	3,4	3,5	2,9	3,9
	Hentriacontano	4,6	22,7	2,7	2,8	4,1	4,2	3,7	3,1	0,8	3,6
	Dotriacontano	2,5	-	1,4	1	1,5	1,1	1,2	1,2	1,7	-
	Tritriacontano	2,5	28,3	1,1	2	2,4	4,1	3	1,9	-	-
Cetona/esteroide	Nonadecano	4,6	-	3,7	5,7	5,9	4,8	4,8	5,2	5,8	3
	Nonacosano	6	19,5	3,6	4,3	6	4,9	5	5,1	2,4	6,8
Isoprenoide	Nor-pristane	-	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-
	Pristano	2,2	-	2,6	2,3	-	-	1,3	1,7	1,7	-
	Fitano	3,2	-	2,5	3,5	2,7	2	2,5	2,8	3,1	-
Éster	Hexadecanoato de etilo	-	-	2	3,3	2,6	2	1,5	4,1	6,8	-
	Linoleato de etilo	-	-	2,9	3,4	-	3,7	3,1	-	4,8	-
	Oleato de etilo	-	-	2,4	2,8	-	2,6	2,1	2,6	5,9	-
Cetona/esteroide	Sitostenona	-	-	2,9	4,4	-	3,1	2,9	-	-	-
	Stigmastan-7-ona	-	-	1	1,7	-	1,3	1,8	-	-	-
Fenólico/aromático	2,5-Di-terc-butilfenol	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-

	Totarol	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido graso	Ácido hexadecanoico	-	-	4,1	-	-	-	-	-	7,9	-
	Ácido linoleico	-	-	10	-	-	-	-	2,3	-	-
	Ácido oleico	-	-	8,1	-	-	-	-	-	-	-

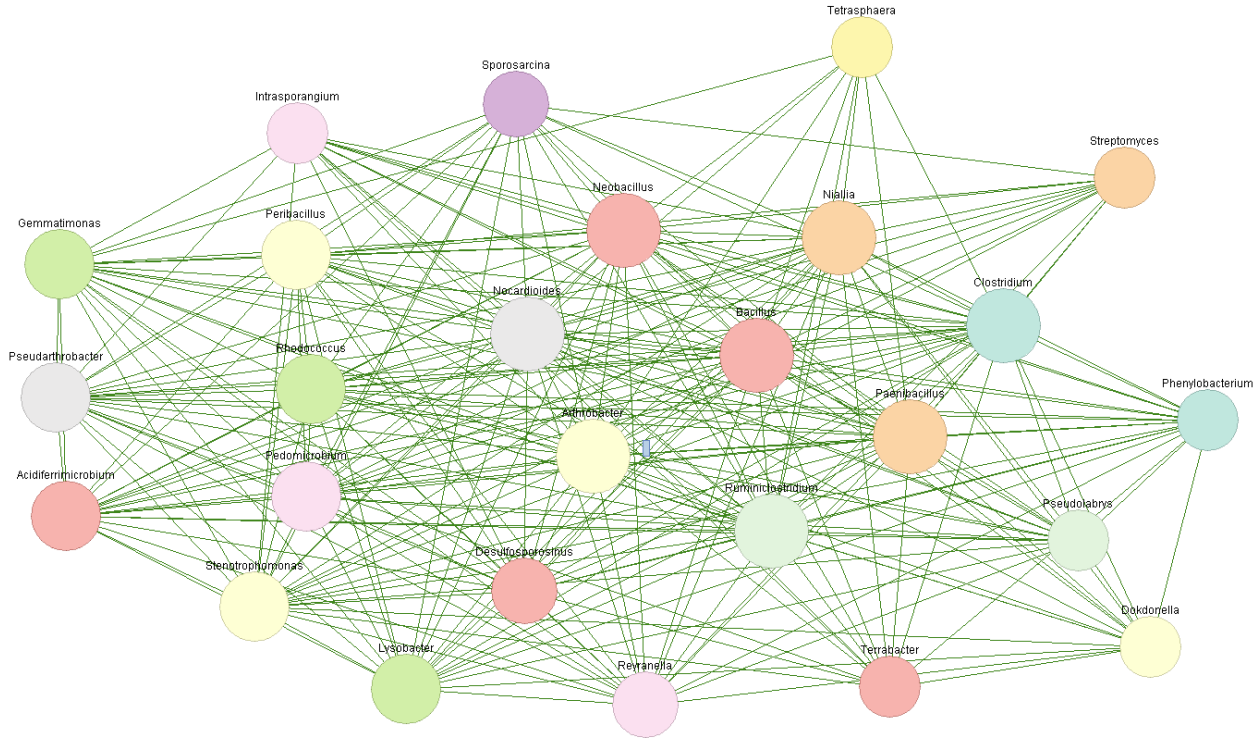
Nota: Cont: Control de crecimiento

Apéndice E. *Cambios en el perfil cromatográfico entre suelo no contaminado y tratamientos del ensayo de degradación de petróleo crudo mediano.*



Nota: Los cromatogramas corresponden a (A): suelo inicial no contaminado; (B): tratamiento 2 (bioestimulación) día 50; (C): tratamiento 3 (atenuación natural) día 50; (D): control de crecimiento día 50; (E): tratamiento 1 (bioestimulación y bioaumentación) día 20; (F): tratamiento 1 (bioestimulación y bioaumentación) día 40.

Apéndice F. *Análisis de coocurrencia de comunidades bacterianas a nivel de género.*



Apéndice G. *Análisis de coocurrencia y antiocurrencia comunidades fúngicas a nivel de género.*

