Análisis de la biorremediación de suelos contaminados con asfaltenos y petróleo crudo pesado utilizando un consorcio microbiano

Oscar Daniel Navas Cáceres

Trabajo De Grado Para Optar El Título De Magíster En Microbiología

Director
German Alexis Zafra Sierra
PhD. en Ciencias en Biotecnología

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Salud
Escuela de Microbiología
Maestría en Microbiología
Bucaramanga
2021

Agradecimientos

Primero que todo quiero agradecer a Dios porque sin el nada sería posible.

A mi familia, mis padres Faustino Navas y Liliana Cáceres, y mis hermanas Leidy y Paula por apoyarme, motivarme y siempre creer en mí. Los amo infinitamente.

A la persona quien me enseñó a ver la vida de la forma más linda, Stefania Correa, gracias por estar a mi lado y apoyarme incluso en los momentos más difíciles.

A mis consentidas Zyra, Uva, Roma y Africa, por acompañarme en todos mis desvelos y entregarme el amor más noble y puro.

A mi director el Dr. German Alexis Zafra Sierra, por creer en mí y brindarme esta gran oportunidad en la que pude crecer personal y profesionalmente. Gracias por su apoyo incondicional, acompañamiento, confianza y amistad.

A todos los miembros del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología - GIBIM, en especial a mis compañeros Lady Quintero, Yuliany Guillin, Andrés Martínez, Mayra Parada, Marlon Cáceres y Marcela Mantilla.

En general gracias a todos aquellos que de alguna forma hicieron parte de este proceso.

Tabla de contenido

Introducción 10

1. Objetivos 13

1.1. Objetivo general 13

1.2. Objetivos específicos 13

2. Marco conceptual 14

2.1. Petróleo crudo e hidrocarburos del petróleo 14

2.2. Crudos pesados y asfaltenos 15

2.3. Toxicidad de los hidrocarburos pesados 16

2.4. Contaminación por hidrocarburos en Colombia 17

2.5. Biorremediación 18

2.5.1. Bioestimulación 19

2.5.2. Bioaumentación 20

2.6. Metabolismo microbiano de los hidrocarburos 21

2.7. Biodegradación de los asfaltenos 22

3. Metodología 25

3.1. Muestras de suelo e hidrocarburos 25

3.2. Aislamiento de microorganismos nativos degradadores de crudo pesados 26

3.3. Descripción e identificación de los aislados 26

3.4. Construcción del consorcio microbiano degradador 27

3.4.1. Evaluación de la tolerancia a asfaltenos puros 27

3.4.2. Evaluación del antagonismo microbiano 28

3.4.3. Prueba de selección inducida en suelo 29

3.5. Ensayos de biodegradación de petróleo crudo pesado y asfaltenos en suelo 30

3.6. Medición de la actividad microbiana 31

3.7.Medición de la Biodegradación 32

3.7.1. Extracción de hidrocarburos totales del petróleo y asfaltenos residuales del suelo 32

3.7.2. Cuantificación de la biodegradación 32

3.8. Análisis estadístico 33

4. Resultados y discusión 34

4.1. Aislamiento e identificación de microorganismos nativos degradadores de crudo pesado 34

4.2. Construcción del consorcio microbiano degradador 38

4.2.1. Evaluación de la tolerancia a asfaltenos puros 39

4.2.2. Evaluación del antagonismo microbiano 42

4.2.3. Prueba de selección inducida en suelo 44

4.3. Biodegradación de crudos pesados y asfaltenos en suelos 46

4.3.1. Actividad respiratoria microbiana durante la biodegradación 46

4.3.2. Eficiencia de la biodegradación de asfaltenos y petróleo crudo pesado 50

5. Conclusiones 57

Referencias Bibliográficas 58

Apéndices 73

Lista de Tablas

Tabla 1. Descripción de los ensayos de biodegradación en suelo 31

Tabla 2. Descripción morfológica de los aislados obtenidos..... 35

Tabla 3. Identificación *BLAST* de bacterias nativas aisladas de suelo contaminado con petróleo crudo pesado. 38

Tabla 4. Pruebas de tolerancia a asfaltenos puros en placa. 41

Lista de Figuras

Figura 1. Diferencias estructurales entre las fracciones SARA. 15

Figura 2. Evaluación del antagonismo microbiano simultaneo entre los aislados más tolerantes a asfaltenos..... 43

Figura 3. Perfil LSSP-PCR de los aislados individuales y de los reactores después de 30 días de incubación en suelo contaminado con asfalteno puro..... 44

Figura 4. Producción de CO_2 durante la biorremediación de suelo contaminado con 10.000 ppm de asfalteno puro. 46

Figura 5. Producción de CO_2 durante la biorremediación de suelo contaminado con 10.000 ppm de petróleo crudo pesado. 49

Figura 6. Biodegradación de asfaltenos después de 52 días de incubación. 52

Figura 7. Biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo después de 52 días de incubación. ……53

Lista de Apéndices

Apéndice A. Protocolo de extracción de adn *salting out* para bacterias gram negativas. 73

Apéndice B. Curvas de crecimiento microbiano en bhi liquido de los aislados pertenecientes al consorcio. 74

Apéndice C. Morfología macroscópica de los aislados obtenidos. 75

Apéndice D. Morfología microscópica de los aislados obtenidos.. 77

Apéndice E. Prueba de tolerancia de los aislados obtenidos hacia los asfaltenos del petróleo crudo……..80

Apéndice F. Aislamiento de microorganismos pasados 30 días de incubación en suelo contaminado con 5.000 ppm de asfaltenos (Dilución 10^{-4}). 82

Resumen

Título: Análisis de la biorremediación de suelos contaminados con asfaltenos y petróleo crudo pesado utilizando un consorcio microbiano[*]

Autor: Oscar Daniel Navas Cáceres[**]

Palabras Clave: Consorcio Microbiano, Asfaltenos, Petróleo Crudo Pesado, Biodegradación.

Descripción: Una de las actividades de mayor impacto en la economía mundial es la exploración y explotación del petróleo. El petróleo crudo pesado y los asfaltenos son compuestos altamente tóxicos y persistentes en el suelo, que causan efectos perjudiciales para el medio ambiente y biodiversidad de los hábitats afectados. Es por esto que, las estrategias de remediación amigables y de bajo costo, como la biorremediación, son importantes para la recuperación de estos ecosistemas. Se considera particularmente importante el uso de consorcios microbianos estables y compatibles para la biodegradación de asfaltenos en el suelo. El objetivo del presente estudio fue evaluar la efectividad de un consorcio microbiano durante el proceso de biorremediación de suelos contaminados con asfaltenos y petróleo crudo pesado. Para ello se realizaron aislamientos microbianos a partir de un suelo contaminado con petróleo crudo pesado, los cuales se identificaron mediante técnicas de biología molecular, para la conformación del consorcio microbiano se realizaron pruebas de tolerancia a asfaltenos, antagonismo microbiano y selección en suelo. Finalmente, se evaluó su capacidad de biodegradación de asfaltenos y petróleo crudo pesado en suelo. Se obtuvieron un total de 22 aislados bacterianos que mostraron la capacidad para utilizar petróleo crudo pesado como única fuente de carbono. Los aislados pertenecieron a diferentes géneros bacterianos reportados como agentes degradadores de hidrocarburos del petróleo y asfaltenos, entre ellos *Pseudomonas, Rhodococcus, Paenibacillus, Tistrella, Bacillus, Micromonospora,* y *Streptomyces*. El consorcio microbiano se conformó por 5 aislados con gran capacidad metabólica, removiendo el 83% de asfaltenos y 64% de petróleo crudo pesado en suelos contaminados, mostrando estabilidad y adaptabilidad elevadas. En conclusión, el consorcio microbiano construido logró adaptarse a un suelo altamente contaminado y biodegradar la mayor parte de los asfaltenos y crudos pesados presentes, siendo potencialmente útil para la biorremediación de suelos contaminados.

---

[*] Trabajo de Grado

[**] Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Director: German Alexis Zafra Sierra. PhD. en Ciencias en Biotecnología.

Abstract

Title: Analysis of the bioremediation of soils contaminated with asphaltenes and heavy crude oil using a microbial consortium[*]

Author: Oscar Daniel Navas Cáceres[**]

Key Words: Microbial Consortium, Asphaltenes, Heavy Crude Oil, Biodegradation.

Description: One of the activities of great incidence in the world economy is the exploration and exploitation of oil. Heavy crude oil and asphaltenes are highly toxic and persistent compounds in the soil, causing detrimental effects on the environment and biodiversity of affected habitats. Therefore, friendly and low-cost remediation strategies such as bioremediation are important for the recovery of these ecosystems, especially the use of stable and compatible microbial consortia for the biodegradation of asphaltenes in the soil. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of a microbial consortium during the bioremediation process of soils contaminated with asphaltenes and heavy crude oil. For this, microbial isolations were made from a soil contaminated with heavy crude oil, which were identified by molecular biology, tests of tolerance to asphaltenes, microbial antagonism and selection in soil were carried out for the formation of a microbial consortium to which it was evaluated the biodegradation capacity of asphaltenes and heavy crude oil in soil. A total of 22 bacterial isolates were obtained that showed the ability to use heavy crude oil as the sole carbon source. The isolates belonged to different bacterial genera reported as degrading agents for petroleum hydrocarbons and asphaltenes, including *Pseudomonas, Rhodococcus, Paenibacillus, Tistrella, Bacillus, Micromonospora*, and *Streptomyces.* The microbial consortium was made up of 5 isolates with great metabolic versatility, removing 83% of asphaltenes and 64% of heavy crude oil in contaminated soils, showing high stability and adaptability. In conclusion, the microbial consortium built managed to adapt to a highly contaminated soil and biodegrade most of the asphaltenes and heavy crude oils present, being potentially useful for the bioremediation of contaminated soils.

---

[*] Degree Work

[**] Faculty of Health. School of Microbiology. Director: German Alexis Zafra Sierra. PhD. in Sciences in Biotechnology.

Introducción

Una de las actividades de mayor impacto en la economía mundial es la exploración y explotación del petróleo. En Colombia, durante el año 2020 se alcanzó una producción equivalente diaria de 697 mil barriles de petróleo (Ecopetrol S.A., 2020). Sin embargo, durante las diferentes etapas de producción se presentan grandes problemas ambientales asociados principalmente a derrames que llevan a la alteración de las condiciones naturales de los ecosistemas, causando efectos tóxicos sobre animales, plantas y microorganismos (Castellanos *et al*., 2015). A pesar de las medidas adoptadas para mitigar los efectos, los derrames siguen siendo un importante problema ambiental a nivel local y nacional; como ejemplo de ello, en 2019 Ecopetrol reportó cinco derrames significativos con un total de 141 barriles de petróleo que afectaron principalmente agua, suelo y vegetación (Ecopetrol S.A., 2019), y en el 2020 Ecopetrol reportó más de 4.200 barriles de petróleo derramados (Ecopetrol S.A., 2020).

En Colombia, la mayor parte de reservas de hidrocarburos existentes corresponden a crudos pesados, los cuales presentan viscosidades y gravedades específicas elevadas debido a sus altos niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), resinas y asfaltenos (Malagón *et al*., 2016). Estos compuestos son altamente persistentes en el ambiente, y debido a sus propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas pueden llegar a generar problemas de salud graves en mamíferos (Abdel-Shafy & Mansour, 2016). Existen diversas metodologías para la recuperación de los ecosistemas contaminados, tales como, tratamientos químicos (absorción por vapor del suelo, oxidación química, , lavado con agentes tensoactivos, electrocinética), tratamientos térmicos (Incineración, desorción térmica y pirólisis), tratamientos físicos (confinamiento en

celdas, barreras impermeables, fijación, filtración por carbón activado) y tratamientos biológicos (bioaumentación, bioestimulación, landfarming, compostaje, fitorremediación, reactores aerobios, reactores anaerobios) (Chan-Quijano *et al*., 2015; Martínez Sepúlveda, 2018). Aunque, generalmente se usa un tren de tecnologías para la recuperación de los ecosistemas, los tratamientos térmicos y fisicoquímicos presentan costos elevados debido a los altos costos de los reactivos y al uso intensivo de energía. Por el contrario, la biorremediación como tratamiento de suelos contaminados es altamente rentable debido a sus bajos costos y a que es una opción segura que minimiza el compromiso ambiental (García & Aguirre, 2014).

Se sabe que los microorganismos presentan actividades metabólicas sobre los hidrocarburos del petróleo crudo pesado, incluidos los asfaltenos, la fracción asfalténica se considera altamente recalcitrante a la biodegradación debido a sus características fisicoquímicas, tales como: elevado peso molecular, complejidad, anillos aromáticos fusionados, tendencia a agregarse, hidrofobicidad, toxicidad y presencia de metales pesados. Existen estudios a escala de laboratorio de la biodegradación de asfaltenos en medio líquido. Por ejemplo, Shahebrahimi y colaboradores estudiaron la biodegradación de los asfaltenos en medio líquidos a diferentes condiciones de temperatura, pH, salinidad y concentración inicial de asfaltenos, obteniendo un porcentaje de degradación máximo de 41,95% por la cepa *Bacillus cereus*YSH-9 (Shahebrahimi *et al*., 2018). Recientemente, reportaron la capacidad de un consorcio microbiano conformado por 9 aislados, los cuales biotransformaron los asfaltenos en un 75% en cultivos líquidos en biorreactor de 1,5 L con agitación (Zargar *et al.*, 2021). Sin embargo, en la actualidad no se tiene conocimiento exacto del mecanismo de biodegradación de asfaltenos y hasta donde conocemos no se han diseñado aproximaciones basadas en la biodegradación de esta fracción en suelos

contaminados, lo cual representaría una situación mas real para una futura escala a condiciones de campo. Por lo cual, se hace necesario la creación de estrategias eficientes de biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo pesado y asfaltenos. La construcción de un consorcio microbiano debidamente identificado, caracterizado y adaptado para la biodegradación de los asfaltenos, puede ser un acercamiento más real de degradación de los asfaltenos en suelo, generando conocimiento más profundo de las interacciones, cometabolismo y mecanismos involucrados en su biodegradación para una eventual aplicación del consorcio en situaciones reales de biorremediación (Snowdon *et al*., 2016). Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, se plantean las siguientes preguntas de investigación: ¿Cuál es la eficiencia de degradación de asfaltenos y petróleo crudo pesado de un consorcio microbiano nativo aislado del pozo petrolero Lizama?

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar la efectividad de un consorcio microbiano durante el proceso de biorremediación de suelos contaminados con asfaltenos y petróleo crudo pesado.

1.2 Objetivos específicos

- Construir un consorcio microbiano a partir de aislados nativos con capacidad para degradar fracciones de petróleo crudo pesado y asfaltenos en suelos.
- Medir la efectividad de la degradación de los asfaltenos y petróleo crudo pesado por el consorcio microbiano

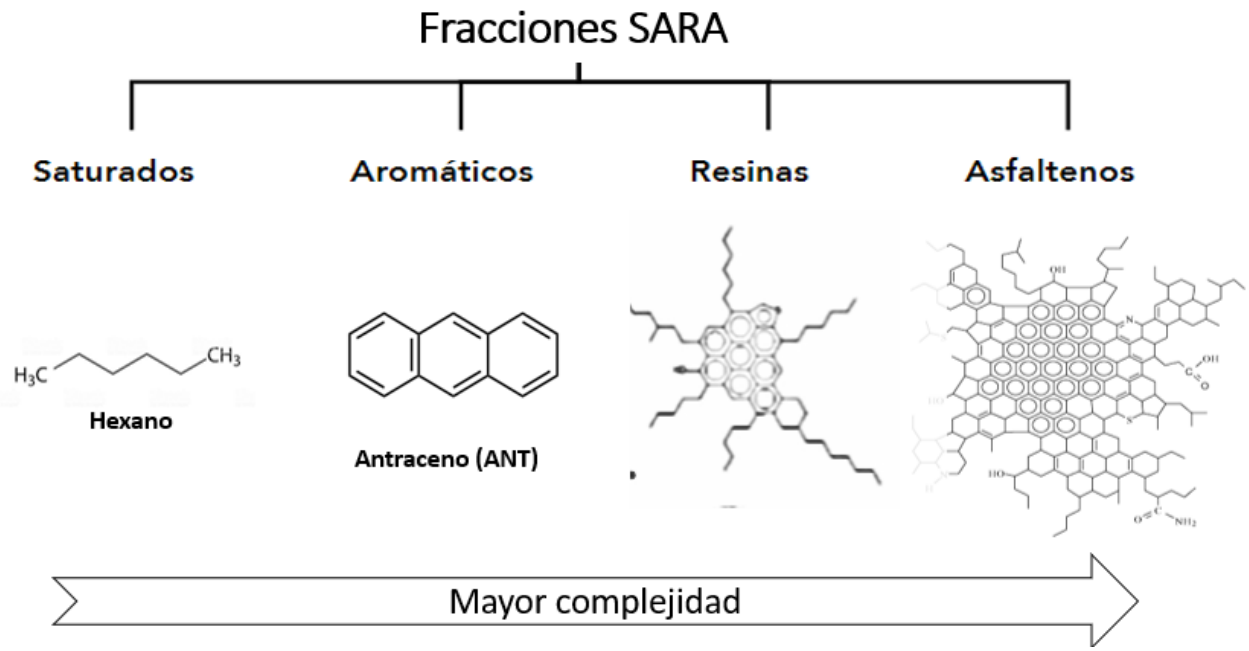
2. Marco conceptual

2.1 Petróleo crudo e hidrocarburos del petróleo

El petróleo crudo es una mezcla heterogénea y compleja de hidrocarburos orgánicos, los cuales están compuestos de hidrógeno y carbono en fase gaseosa, liquida o sólida, en donde la estructura molecular de los hidrocarburos varía desde compuestos simples, como el metano, hasta compuestos más complejos y de diferentes pesos moleculares (Podgorski *et al*., 2013). La naturaleza compleja de los crudos hace que el estudio de su composición molecular sea difícil. Por ello, según la polaridad y solubilidad en diferentes solventes orgánicos, sus componentes se clasifican en cuatro fracciones principales: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos, denominadas fracciones SARA (Fig. 1) (Brown *et al.*, 2017). Los saturados son los componentes más ligeros del petróleo crudo, los cuales consisten principalmente de alcanos no polares con cadenas lineales o ramificadas y parafinas cíclicas alifáticas. Los aromáticos son hidrocarburos con uno o más anillos aromáticos unidos con cadenas alifáticas, que normalmente contienen heteroátomos incrustados. Las resinas y asfaltenos son moléculas polares, polinucleares, compuestas de anillos aromáticos, cadenas laterales alifáticas y heteroátomos. Estas dos últimas fracciones difieren principalmente en su definición operacional y en que los constituyentes químicos de los asfaltenos presentan mayores pesos moleculares y contenidos de heteroátomos y metales pesados. Una manera de clasificar los crudos es mediante la gravedad API (Instituto Americano del Petróleo), que tiene en cuenta la densidad del crudo con respecto a la del agua; de acuerdo a ello se clasifican en crudos livianos que presentan una gravedad API > 31,1°, medianos entre 22,3° y 31,1°, pesados de 10,0° a 22,3° y extrapesados menor a 10.0° (Gudiña & Teixeira, 2017).

Figura 1

Diferencias estructurales entre las fracciones SARA.



2.2 Crudos pesados y asfaltenos

Los crudos pesados y extrapesados presentan viscosidades y densidades altas debido a su composición molecular o presencia de contenidos altos de resinas y asfaltenos, por lo que generalmente son producidos por métodos no convencionales (Gudiña & Teixeira, 2017). El contenido SARA de este tipo de crudos en diferentes reservorios en todo el mundo varía considerablemente; sin embargo, en general los crudos pesados contienen bajos niveles de saturados y altos niveles de compuestos aromáticos, resinas y asfaltenos (Brown *et al*., 2017).

Los asfaltenos se consideran la fracción más pesada y polar del petróleo crudo. Son compuestos solubles en solventes aromáticos como benceno y tolueno, pero insolubles en n-alcanos (Gudiña & Teixeira, 2017); la estructura química de los asfaltenos se basa

principalmente en carbono e hidrogeno, seguido de azufre, nitrógeno y en menor proporción contienen metales pesados como el níquel, cobre, hierro y vanadio. Son considerados como uno de los componentes más complejos en el petróleo crudo, con un peso molecular promedio de aproximadamente 750 g mol $^{-}$1, el cual puede ser tan bajo como 400 g mol $^{-}$1 y tan alto como 1000 g mol $^{-}$1, dependiendo del origen del petróleo crudo (He *et al*., 2015). Existen dos modelos para describir la naturaleza de la organización del núcleo aromático dentro de los compuestos de asfaltenos: el modelo clásico de organización en islas, que representa a los asfaltenos en un núcleo aromático con cadenas laterales de alquilo periférico, y el modelo del archipiélago que sugiere que los asfaltenos contienen más de un núcleo aromático unido por puentes alquílicos (Chacón-Patiño *et al.*, 2017). Se considera que, en promedio, las partes poliaromáticas de los asfaltenos están compuestas por 7 anillos aromáticos fusionados (Sjöblom *et al.*, 2015). Aunque el modelo clásico de islas es el más aceptado, existen estudios que indican que ambos modelos coexisten en los asfaltenos del petróleo y que la estructura dominante (isla o archipiélago) posiblemente depende de la muestra de asfaltenos (Chacón-Patiño *et al*., 2017).

2.3 Toxicidad de los hidrocarburos pesados

Los hidrocarburos del petróleo se han estudiado ampliamente por su efectos citotóxicos, cancerígenos, genotóxicos y mutagénicos en la salud humana (Kim *et al*., 2013). Los asfaltenos al ser la fracción más pesada de hidrocarburos en el petróleo crudo, presentan poca volatibilidad y solubilidad tanto en agua como en solventes orgánicos disminuyendo su biodisponibilidad y toxicidad. Sin embargo, los asfaltenos persisten durante décadas en suelos contaminados, lo que causa efectos negativos sobre las propiedades del suelo, como una mayor toxicidad, espacios reducidos en los poros; pH, conductividad eléctrica, textura, densidad aparente y formación de

costras de aceite que limitan la difusión del oxígeno, de tal manera que dificultan su remediación. (Brown *et al.*, 2017). Además, los suelos contaminados con petróleos pesados pueden presentar riesgos de toxicidad por metales pesados como Manganeso (Mn), Hierro (Fe), Cobre (Cu), Zinc (Zn), Plomo (Pb), Níquel (Ni), Cobalto (Co), Cadmio (Cd) y Cromo (Cr), debido a la presencia de estos principalmente en las moléculas de los asfaltenos (Chinedu & Chukwuemeka, 2018).

2.4 Contaminación por hidrocarburos en Colombia

La economía colombiana depende en gran medida de la industria del petróleo, no obstante, la exploración, refinación y transporte del petróleo han generado un gran número de derrames, impactando el medio ambiente. Estos derrames pueden ocurrir de manera accidental, voluntaria, o por atentados de grupos que se encuentran al margen de la ley. Dada la gran biodiversidad de ecosistemas naturales, ríos, lagos y zonas marinas, Colombia presenta gran vulnerabilidad a eventos de origen natural y antrópico de contaminación por derrames de petróleo. A lo largo de los años se han presentado gran cantidad de derrames de petróleo en Colombia. Tan solo en los últimos cinco años Ecopetrol reportó un total de 38 derrames significativos, con un total de 1109 barriles de petróleo derramados (Ecopetrol S.A., 2018, 2019, 2020). El principal derrame del año 2018 se presentó debido al afloramiento natural del pozo 158 Lizama, con un total de 530 barriles derramados (Ecopetrol S.A., 2018). Durante el año 2020, Ecopetrol reportó 126 incidentes en los cuales se vertieron al ambiente más de 4.200 barriles de petróleo, generando impactos ambientales negativos en suelos y recursos hídricos (Ecopetrol S.A., 2020).

2.5 Biorremediación

La biorremediación es el proceso que se basa en el uso de microorganismos o derivados de estos, para la transformación completa o incompleta de contaminantes ambientales a compuestos menos tóxicos o formas minerales no tóxicas, que generen menor impacto al ambiente y a la salud humana (Azubuike *et al*., 2016). El pH, los nutrientes disponibles, la temperatura, la humedad, el oxígeno, la concentración de microorganismos y sus interacciones son factores importantes que impactan el crecimiento de microorganismos degradadores y deben ser tenidos en cuenta para una adecuada biorremediación (Al-Hawash *et al*., 2018). La biodisponibilidad o cantidad de hidrocarburo accesible para el microorganismo es uno de los factores más importantes en la biorremediación de suelos contaminados con petróleos pesados. La tasa de transferencia de los hidrocarburos desde el suelo a la célula viva y la tasa de absorción y metabolismo por parte del microorganismo, determinan la biodisponibilidad del petróleo crudo (Semple *et al.*, 2003). El tamaño y la concentración de los hidrocarburos del petróleo pesado también son importantes en su biodegradación. En el petróleo, los compuestos pequeños y simples como los n-alcanos, iso-alcanos, cicloalcanos son los primeros en ser degradados, seguidos por compuestos más complejos como los aromáticos, poliaromáticos, resinas y asfaltenos, respectivamente. De esta forma, la biodegradación de petróleo crudo se da secuencialmente iniciando por las moléculas simples hasta las más complejas (Adams *et al*., 2015). Existen dos principales estrategias que se usan en biorremediación de suelos, bioestimulación y bioaumentación, las cuales están destinadas a mejorar las tasas de biodegradación de los contaminantes y así lograr mayor eficiencia en la biorremediación.

2.5.1 Bioestimulación

La bioestimulación es la adición de nutrientes o la modificación de factores abióticos en el ambiente contaminado para aumentar la población o la actividad de los microorganismos naturales disponibles para la biorremediación (Tyagi *et al*., 2011). Esta estrategia se ha usado en diferentes estudios de biodegradación del petróleo crudo, en donde la adición de nutrientes estimula la densidad de microorganismos heterótrofos y degradadores (Dong *et al*., 2015; Vallejo *et al.*, 2016), enriqueciendo y seleccionando incluso aquellas comunidades bacterianas degradadoras de hidrocarburos que no se han podido cultivar y que, por lo tanto, no se pueden usar en estrategias como la bioaumentación (Chikere *et al*., 2012).

La bioestimulación requiere de la evaluación de los parámetros ambientales involucrados en el proceso *in situ* y las capacidades de degradación intrínseca de la flora autóctona (Margesin & Schinner, 2001). Generalmente, se adicionan varias formas de nutrientes limitantes y aceptores de electrones, como fósforo, nitrógeno, oxígeno o carbono que, de forma natural, se encuentran poco disponibles limitando la actividad microbiana (Dong *et al.*, 2015). Además, se usan diferentes bioestimulantes y texturizantes, tales como materiales orgánicos derivados de árboles (Al-Saleh & Hassan, 2016), harina de hueso de carne (Liu *et al.*, 2019), salvado de trigo (Zhan *et al.*, 2017), bagazo de caña (Zafra *et al*., 2017) e incluso se usan compuestos químicos que faciliten la biodisponibilidad del petróleo crudo, como lo son los surfactantes Tween 80 y 40 (Yanto & Tachibana, 2014a).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, la principal ventaja de la bioestimulación es el uso de los microorganismos nativos presentes el entorno, los cuales se encuentran distribuidos espacialmente dentro del subsuelo. Por otro lado, el principal desafío de esta

estrategia es garantizar que los nutrientes suministrados estén fácilmente disponibles para los microorganismos nativos, teniendo en cuenta la geología local del suelo y subsuelo. Los subsuelos de tipo arcilloso u otro material de grano fino dificultan la propagación de los nutrientes suministrados en toda la zona afectada y las fracturas en el subsuelo crean vías preferenciales que siguen los nutrientes suministrados, impidiendo su distribución uniforme (Adams *et al.,* 2015).

2.5.2 Bioaumentación

La bioaumentación es la adición de poblaciones microbianas, bien sea de cepas individuales o consorcios, especializados en la degradación del contaminante (Tyagi *et al.,* 2011). El aislamiento, identificación y selección de microorganismos con capacidad de biodegradación es esencial para el desarrollo y la optimización de estrategias para mejorar la biorremediación *in situ* (Sarkar *et al.,* 2017), siendo los microorganismos nativos presentes en ambientes contaminados por décadas, los que desempeñan un papel clave en la biodegradación y la biorremediación. Estos han generado las adaptaciones necesarias para soportar la presencia del contaminante y garantizar su supervivencia (Medina e*t al.,* 2014; Santisi *et al*., 2019). Por otro lado, se ha evidenciado que el uso de consorcios microbianos o mezclas de diferentes microorganismos, que funcionen en sintonía, ayuda a degradar una gama más amplia de compuestos del petróleo, en especial, las fracciones más complejas como los asfaltenos (Ghazali *et al.,* 2004).

La bioaumentación es necesaria cuando las poblaciones microbianas nativas del suelo se encuentran en recuentos bajos, como resultado de la reciente exposición al derrame, o cuando no pueden asimilar metabólicamente la diversa gama de sustratos potenciales presentes en el

petróleo crudo. Además, la velocidad de descontaminación es un factor importante para tener en cuenta, y la inoculación de microorganismos previamente caracterizados puede reducir el tiempo del proceso de biorremediación (Adams *et al*., 2015). La eficiencia de esta estrategia depende de la capacidad de los microorganismos bioaumentados para competir con los microorganismos indígenas y depredadores, sobrevivir a factores abióticos adversos que afectan su proliferación (las estructuras químicas, concentración y biodisponibilidad de los contaminantes), la habilidad de degradar la mayoría de los componentes del petróleo, mantener la estabilidad genética y la viabilidad durante el proceso, y la capacidad de moverse a través del suelo hacia el contaminante (Adams *et al*., 2015).

Finalmente, se ha evidenciado que la aplicación conjunta de la bioaumentación y bioestimulación, ha demostrado ser un tratamiento efectivo al generar mayores tasas de biodegradación. Por ejemplo, en un estudio se emplearon estos dos enfoques en conjunto al bioaumentar con una cepa de *Trichoderma asperellum* altamente tolerante a los hidrocarburos, y con bagazo de caña y nutrientes, obteniéndose tasas altas de degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de peso molecular alto y bajo (Zafra *et al.*, 2014).

2.6 Metabolismo microbiano de los hidrocarburos

El metabolismo microbiano de los hidrocarburos del petróleo se da de manera secuencial, iniciando con los hidrocarburos más simples. En este sentido, los alcanos lineales y ramificados son los primeros compuestos biodegradados principalmente por ω-oxidación y β-oxidación. El pristano generalmente se toma como referencia general de un hidrocarburo ramificado, para el cual los procesos bioquímicos involucrados en la degradación son ω y β-oxidación (Pineda-Flores & Mesta-Howard, 2001).

Otro de los hidrocarburos más estudiados en cuando rutas de biodegradación es el dibenzofurano, el cual mediante el ataque de diferentes dioxigenasas, se transforma en trihidroxibifenilo y luego en catecol o ácido gentístico. Estos últimos se acumulan en el medio y pueden usarse como fuente de energía (Fortnagel *et al*., 1990). El fenantreno es atacado inicialmente por dioxigenasas para producir un dihidroxifenantreno que sufre una rotura en la meta posición, produciendo compuestos que se transformarán a lo largo de la ruta del ácido tricarboxílico. El pireno es un HAP de cuatro anillos, en donde la apertura del primer anillo se lleva a cabo por la actividad de dioxigenasas y monooxigenasas en posición orto, para luego continuar con la ruptura de los tres anillos, en un mecanismo similar al del fenantreno. El benzo [*a*] pireno se compone de cinco anillos y es uno de los HAPs más cancerígenos. Su degradación se ha establecido completamente (Seo *et al.,* 2009).

2.7 Biodegradación de los asfaltenos

Por un largo período de tiempo no se reportó evidencia suficiente de que los microorganismos pudieran degradar las moléculas de asfalteno, ya que las características asociadas a su estructura molecular compleja hacen que sean el componente menos biodegradable del petróleo crudo. Por lo anterior, inicialmente se consideraron como compuestos recalcitrantes a la biodegradación; sin embargo, hoy en día existen evidencias del uso de los asfaltenos como fuente de carbono y energía por diferentes microorganismos. Uribe-Álvarez *et al* en 2011 demostraron el crecimiento de *Neosartorya fischeri* en un medio que contiene asfalteno como única fuente de carbono y energía, siendo una evidencia contundente de la capacidad de algunos microorganismos para metabolizar y mineralizar los asfaltenos (Uribe-Alvarez *et al.*, 2011). Desde entonces, se han aislado e identificado diferentes microorganismos degradadores de asfaltenos, ya sean bacterias u

hongos. En cuanto a las bacterias, se reportó una cepa de *Garciaella petrolearia* que presentó mayor biodegradación de asfaltenos al ser bioestimulada con melaza al 1% *(Lavania et al*., 2012); una cepa de *Bacillus toyonensis* que presentó una biodegradación del 64.8% después de 50 días de incubación a 25 °C (Kashi *et al*., 2018); aislados de *Bacillus cereus, Microbacterium paraoxydans, Enterobacter cloacae, Stenotrophomonas maltophilia, Staphylococcus saprophyticus* se han obtenido e identificado a partir de diferentes suelos contaminados con petróleo, agua de reservorio, petróleo crudo y muestras de lodo de petróleo, siendo *Bacillus cereus* el microorganismo que presentó el mayor rendimiento de remoción de asfaltenos, degradando 41,95% después de 60 días de incubación a 60 ° C en un medio con 35 g /L de asfaltenos (Shahebrahimi *et al*., 2018).

Más de veinte especies de bacterias que utilizan los asfaltenos como única fuente de carbono y energía se aislaron de muestras de petróleo y suelos contaminados en Irán. Los microorganismos que presentaron mejor crecimiento en medio de cultivo mineral suplementado con asfaltenos fueron *Pseudomonas* sp, *Bacillus licheniformis, Bacillus lentus, Bacillus cereus* y *Bacillus firmus*, los cuales mostraron un porcentaje de degradación mayor de asfaltenos cuando se cultivaron juntos (Tavassoli *et al*., 2012). El uso de consorcios microbianos es un acercamiento más eficaz en la bioconversión de asfaltenos que los cultivos puros, debido a la complejidad de los asfaltenos es posible que para su biotransformación se requiera de la acción sinérgica de diferentes microorganismos. Por ejemplo, la aplicación de un cultivo mixto de *Acinetobacte*r sp., *Pseudomonas* sp. y *Mycobacterium* sp en la biorremediación de las aguas residuales mostró un 86% de remoción de hidrocarburos (J. García *et al*., 2019). Un co-cultivo de *Pestalotiopsis* sp. y *Polyporus* sp. degradó las fracciones del petróleo crudo, incluidas las más

pesadas (Yanto & Tachibana, 2014b). Consorcios microbianos conformados por diferentes cepas bacterianas como *Corynebaterium* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., y *Staphylococcus* sp., aislados de muestras de crudo pesado, presentan mayor capacidad de usar asfaltenos como única fuente de carbono y energía (Pineda-Flores *et al.*, 2004). Un consorcio compuesto por *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* degradó el 51,5% de los asfaltenos presentes, mientras que un consorcio compuesto por *Citrobacter amalonaticus* y *Enterobacter cloacae* degradó el 43%. Finalmente, un consorcio compuesto por *Bacillus cereus* y *Lysinibacillus fusiformis* degradó el 33,5% y *Staphylococcus hominis* degradó el 21,5%. El análisis de FT-IR evidenció que los grupos funcionales alqueno y alquino eran fácilmente biodegradables, mientras que los aldehídos resistían la biodegradación (Jahromi *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha observado que la aplicación conjunta de la bioestimulación y bioaumentación es un tratamiento efectivo al generar mayores tasas de biodegradación. Zafra y colaboradores usaron estos dos enfoques en conjunto al bioaumentar con una cepa de *Trichoderma asperellum* altamente tolerante a los hidrocarburos y bioestimular con bagazo de caña, obteniendo tasas altas de degradación de HAPs de peso molecular alto y bajo (Zafra, Moreno-Montaño, *et al.*, 2014).

Hasta el momento, las rutas implicadas en la degradación de hidrocarburos más grandes como los asfaltenos no se han descrito. Sin embargo, se ha evidenciado el aumento de la producción de enzimas extracelulares tales como peroxidasas, lacasas, esterasas y lipasas, las cuales pueden ser útiles para descomponer los asfaltenos en hidrocarburos menos complejos y degradarlos por rutas descritas anteriormente para HAPs (Cerniglia & Sutherland, 2010). Se ha demostrado la oxidación de HAPs por la enzima lacasa CotA producida por *Bacillus subtilis* (Zeng *et al.*,

2016), así como la presencia de actividades catalíticas de peroxidasas producidas en la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por una mezcla de bacterias, entre las que se encuentran *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. (Shekoohiyan *et al.,* 2016), Ghollami y colaboradores obtuvieron un 37,3% de bioconversión de resinas del petróleo crudo por consorcios de aislados nativos, en donde *Serratia* sp., *Raoultella* sp. y *Ochrobactrum* sp. se identificaron como parte del consorcio (Ghollami *et al.*, 2013).

3. Metodología

3.1 Muestras de suelo e hidrocarburos

Se obtuvo una muestra de crudo pesado Lizama con gravedad API de aproximadamente 17.8 y una composición aproximada de saturados: 38%, aromáticos: 20%, resinas: 21%, asfaltenos: 11%; y una muestra de asfalteno puro extraído del crudo pesado Castilla, precipitado con n-heptano y una composición aproximada de C: 84 %, H: 8 %, N: 1.5 %, S: 4.5 %, O: 1.5 %, H/C: 1.14, Ni:406 ppm, Va: 1601 ppm, PM: 2000 daltons. Para el aislamiento de microorganismos nativos se obtuvo una muestra de suelo intemperizado contaminado con petróleo crudo del campo La Lizama Santander (7°05'39.7"N; 73°33'29.7"W). Para ello, se recolectaron 100 g de suelo de forma aleatoria a una profundidad entre 0 y 30 cm, siguiendo los procedimientos recomendados por la EPA (U.S. EPA, 1996). Las muestras de suelo y petróleo se conservaron hasta su uso en refrigeración a 4 °C y las muestras de asfaltenos a temperatura ambiente protegidas de la luz.

3.2 Aislamiento de microorganismos nativos degradadores de crudo pesados

Los aislamientos de bacterianos se obtuvieron a partir de la muestra de suelo contaminado utilizando medios de enriquecimiento que permitieron seleccionar los microorganismos con mayor potencial de degradación de asfaltenos (Hernández-León *et al*., 2010; Zafra, Absalón, *et al.*, 2014). A partir de 1 g de suelo contaminado se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada hasta 10^{-6}, se inoculó de forma masiva 100 µl de cada dilución en placas de medio mínimo M9 (Na_2HPO_4 12,8 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH_4Cl 1 g/L, $MgSO_4*7H_2O$ 1 g/L, $CaCl_2*2H_2O$ 0,015 g/L, $Fe_2SO_4*6H_2O$ 0,01 g/L) suplementado al 0.1% con crudo pesado Lizama como única fuente de carbono y se incubaron a 30 °C hasta observar crecimiento. Se seleccionaron las colonias obtenidas y se purificaron en cajas del mismo medio. Posteriormente, se realizó descripción morfológica de cada una de las colonias obtenidas, para lograr obtener una adecuada descripción, se repicaron en medio BHI sólido y en el caso de los actinomicetos en medio sales-almidón-caseína-agar SCA (Almidón 10 g/L, Caseína 0,3 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, NH_4Cl 2 g/L, $MgSO_4*7H_2O$ 0,05 g/L, $Fe_2SO_4*6H_2O$ 0,01 g/L). Las colonias purificadas se conservaron a -80 °C en glicerol al 10 %.

3.3 Descripción e identificación de los aislados

Se realizó una descripción inicial de los aislados con base a su morfología macroscópica y microscópica en aumento 100X. Posteriormente, se identificaron por biología molecular mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento de aproximadamente 1.400 pb del ARNr 16S de las cadenas *forward* y *reverse.* Las extracciones de ADN para bacterias Gram positivas se realizaron usando el kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit Protocol* (Promega), con ayuda de la enzima lisozima para la lisis celular. Para las bacterias Gram

negativas se empleó el método de *salting out* estandarizado en este trabajo (Ver apéndice A). La amplificación del fragmento del ARNr 16S se realizó bajo las siguientes condiciones: $MgCl_2$ 1.8 mM, dNTPs 200 µM, Buffer PCR 1X, primer P27F (GAGTTTGATCCTGGCTCA) 0.2 µM, primer P1525R (GAAAGGAGGAGATCCAGC) (Lane, 1991), 0.2 µM, Taq DNA polimerasa 1U y 1 µl de ADN molde en un volumen total de reacción de 20 µl. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (Biorad CFX 96 Touch) a 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 45 seg, 58°C por 30 seg, 72°C por 1:15 m y una amplificación final a 72°C por 1 m. La amplificación se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y posteriormente los amplicones fueron recuperados y secuenciados. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias presentes en la base de datos *GenBank*, utilizando la plataforma *BLAST*, identificándose de acuerdo con el grado de similitud (Boratyn *et al*., 2013).

3.4 Construcción del consorcio microbiano degradador

La construcción del consorcio microbiano con capacidad para degradar asfaltenos y petróleo crudo pesado en suelos se realizó mediante la selección de aislados bacterianos en función de: 1. La capacidad para crecer a expensas de petróleo crudo como única fuente de carbono (apartado 3.2). 2. La habilidad para tolerar concentraciones elevadas de asfaltenos. 3. Los resultados de las pruebas de antagonismo microbiano. 4. La capacidad de supervivencia en suelo contaminado con asfaltenos.

3.4.1 Evaluación de la tolerancia a asfaltenos puros

Para la construcción adecuada de un consorcio microbiano especializado en la degradación de la fracción asfalténica de los hidrocarburos, es necesario determinar el nivel de tolerancia hacia ésta. Para ello, se prepararon preinóculos a una concentración de $1{,}5x10^8$ UFC/ml (Tubo № 0.5

de la escala McFarland) a partir de cultivos frescos en medio BHI de cada uno de los aislamientos. Posteriormente, se sembró 10 µl de cada aislado en forma de gota en cajas con medio BHI con concentraciones de 100, 600, 1.000, 3.000, 6.000, 8.000, 10.000, 20.000 y 60.000 ppm de asfaltenos, y se incubó a 30°C por dos semanas con seguimiento diario. Los ensayos se realizaron por duplicado. Para la preparación de los medios con asfaltenos, se utilizó una solución madre de asfaltenos diluidos en tolueno. Esta solución se mezcló con medio BHI aún líquido en proporción a la concentración final deseada y se sirvió en placas de Petri de vidrio hasta la solidificación del medio, y evaporación total del solvente. La obtención de crecimiento microbiano en forma de colonias visibles se consideró indicativo de tolerancia, mientras que los aislados que no evidenciaron crecimiento microbiano se consideraron no tolerantes a la concentración de asfaltenos evaluada (Zafra *et al.*, 2014).

3.4.2 Evaluación del antagonismo microbiano

Para definir la compatibilidad entre los aislados más tolerantes, es decir, aquellos que toleraron hasta 60.000 ppm de asfaltenos, se realizaron pruebas de antagonismo microbiano mediante el método de inhibición simultanea (Pérez-Terrón, Gonzalez-Montfort & Muñoz-Rojas, 2014). Inicialmente se realizaron curvas de crecimiento microbiano en BHI para determinar las velocidades especificas (Apéndice B). Como presentaron velocidades específicas de crecimiento similares, cada microorganismo seleccionado se ajustó a una concentración de $1{,}5x10^8$ UFC/ml (Tubo № 0.5 de la escala McFarland) y con la ayuda de un hisopo, se sembró de forma masiva en medio BHI sólido. Posteriormente, sobre estas siembras se colocó una gota de 10 µl de cada uno de los aislados restantes, y se incubó a 30°C por 24 horas. El antagonismo microbiano del aislado sembrado en forma de gota hacia el aislado sembrado en masivo se

determinó mediante la presencia de halos de inhibición, y la inhibición del aislado sembrado de forma masiva hacia los aislados sembrados en gota se determinó por la ausencia de crecimiento de los aislados sembrados en gota.

3.4.3 Prueba de selección inducida en suelo

Entre los aislados más tolerantes a asfaltenos y que no presentaron relaciones antagónicas, se seleccionaron aquellos microorganismos que lograron permanecer por largos periodos de tiempo en suelos contaminados con asfaltenos. Para ello, en biorreactores por duplicado se realizó la selección inducida en suelo de los microorganismos (Zafra *et al*., 2017). Los biorreactores consistieron en erelemeyers de 100 ml conformados por 0,35 g bagazo de caña de azúcar estéril como agente texturizante, 6,65 g de suelo estéril (se autoclavó dos veces a 120 °C por 15 min) previamente enriquecido con 5.000 mg kg -1 de asfaltenos como factor selectivo y 3 ml de medio Czapeck con una concentración de 2×10^6 UFC g-1 de cada aislado seleccionado. Se ajusto el contenido de humedad al 30% y se incubó a 30 °C durante 30 días. Cada 48 h se realizó aireación y se extrajo ADN genómico total al día 30 (Mediante el kit *DNeasy PowerSoil Kit - QIAGEN*) para identificar los microorganismos que persistieron en el biorreactor mediante PCR, con un sólo oligonucleótido, en baja astringencia (LSSP-PCR). Esta técnica permitió generar perfiles de bandas altamente reproducibles y específicas para cada aislado, identificándose así los microorganismos sobrevivientes. Para ello, a partir de un gel de agarosa al 1%, se recuperó la banda del producto de PCR 16S de cada cepa seleccionada y se disolvió en 100 µl agua de grado molecular. Posteriormente, se tomó 2 µl del fragmento de PCR recuperado y se empleó como ADN molde de la reacción, la cual se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, con las siguientes condiciones: primer 27F, 5 µM; dNTPs, 200 µM; Buffer PCR, 1X; Taq DNA

polimerasa, 3U; $MgCl_2$, 3 mM. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (Biorad CFX 96 Touch) a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 34 °C por 1 m, 72°C por 1 m. Los productos se separaron en gel de agarosa al 2.4%, utilizando TBE 1X como buffer de corrida y se usó el programa Image Lab 6.0.1 para calcular el tamaño de las bandas en pares de bases (pb). Los resultados obtenidos se confirmaron mediante el aislamiento e identificación de las aislados al día 30 de incubación. Para ello, se tomó 1g de suelo y se realizaron diluciones seriadas hasta alcanzar el título de 10^{-5}, se sembró 100 µl de cada dilución en cajas de medio solido BHI y se incubó a 30 °C por 24 h. Se identificaron los microorganismos sobrevivientes con base en sus características morfológicas, macroscópicas y microscópicas.

3.5 Ensayos de biodegradación de petróleo crudo pesado y asfaltenos en suelo

Se realizaron ensayos de biodegradación de asfaltenos y petróleo crudo pesado puros en suelo, utilizando una combinación de bioestimulación y bioaumentación, como estrategia de biorremediación (Tabla 1). Los ensayos de biodegradación se realizaron en biorreactores que, consistieron en erlenmeyers de vidrio estériles de 100 ml con sello hermético de caucho, conteniendo 19,95 g de suelo no estéril contaminado, 1,05 g bagazo de caña estéril (se autoclavó dos veces a 120 °C por 15 m) en relación 95:5 y una humedad de 30%. Para ello, se pesó 19,95 g de suelo que se contaminó con 10.000 mg Kg^{-1} de asfaltenos o petróleo crudo pesado, agregando 19,95 ml de una solución madre de 10.000 ppm de asfaltenos o petróleo crudo pesado, diluidos en tolueno. El tolueno se dejó evaporar totalmente en plancha de calentamiento a 45 °C y se agregó 1.05 g de bagazo de caña estéril. Los biorreactores se inocularon con 9 ml de medio Czapek con $5x10^7$ UFC/ml de cada microorganismo del consorcio previamente seleccionado. Los reactores se sellaron con septa de caucho estéril y se incubaron a 30 °C durante 52 días. Se

realizó aireación y medición de CO_2 cada 48 horas y al final de la incubación, se determinó el porcentaje de biodegradación. Todos los ensayos de biodegradación se realizaron por triplicado.

Tabla 1

Descripción de los ensayos de biodegradación en suelo

Ensayos	Tratamientos
1. Suelo no estéril contaminado con asfalteno	1. Bioestimulación y bioaumentación 2. Bioaumentación 3. Control bioaumentado no contaminado
2. Suelo no estéril contaminado con petróleo crudo pesado	1. Bioestimulación y bioaumentación 2. Bioaumentación 3. Control bioaumentado no contaminado

Nota: Todos los ensayos re realizaron por triplicado.

3.6 Medición de la actividad microbiana

Como una medida indirecta del crecimiento microbiano, se midió cada 48 horas la cantidad de CO_2 producido por cada uno de los biorreactores. Para ello se aireó por 15 minutos cada biorreactor mediante un sistema que constaba de una bomba de aire acoplada a una trampa de KOH para la captura el CO_2 ambiental, una trampa de agua destilada estéril y un filtro de 0.22 µm para mantener la esterilidad del sistema. El CO_2 que se sale de cada reactor se capturó en 15 ml de NaOH 0,2N. Posteriormente, se añadió 1 ml de una solución $BaCl_2$ al 2%, la cual precipita el carbono atrapado por el NaOH, favoreciendo la formación de $BaCO_3$. Finalmente, el exceso de NaOH en la solución se tituló con HCl 0,2N de tal forma que, la cantidad de CO_2 producido en cada biorreactor durante la respiración microbiana, fue inversamente proporcional al volumen de HCl gastado en la titulación (Serrano Silva *et al.,* 2009). Adicionalmente, como método complementario y de confirmación, se utilizó el detector de CO_2 portátil AZ 7752 con sensor de guía de onda NDIR (infrarrojo no dispersivo). Para cada uno de los tratamientos se utilizó como

control un reactor inoculado con el consorcio, que no se contaminó con asfaltenos o petróleo crudo pesado. Los ensayos de medición de CO_2 se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron en mg CO_2 g^{-1} IDM.

3.7 Medición de la Biodegradación

3.7.1 Extracción de hidrocarburos totales del petróleo y asfaltenos residuales del suelo

Previamente al proceso de extracción, el suelo de cada uno de los biorreactores se secó, tamizó, homogenizó y se midió el porcentaje de humedad. La extracción se realizó mediante el método agitación-centrifugación. Para ello, en un tubo falcón de 50 ml se pesó 2 g de suelo seco de cada biorreactor y se mezcló con 1 g de Na_2SO_4 anhidro. Se adicionó 15 ml del solvente extractor; en el caso de los suelos contaminados con asfalteno se utilizó tolueno y metanol en relación 2:1 y para los suelos contaminados con petróleo crudo pesado se utilizó metanol, tolueno y diclorometano en relación 1:1:1. Se agitó fuertemente en vórtex durante 1 min y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante (extracto orgánico) y se colocó en frascos de vidrio para su cuantificación. El proceso se realizó hasta obtener aproximadamente 30 ml del sobrenadante (Fernández Linares *et al*., 2006). Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

3.7.2 Cuantificación de la biodegradación

La cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo (HTPs) y asfaltenos se realizó por triplicado mediante gravimetría (Fernández Linares *et al*., 2006), en donde el recipiente vacío donde se colocó el extracto orgánico obtenido se llevó a peso constante y se anotó su peso (RA).

Se añadió el extracto orgánico obtenido y se evaporó totalmente el solvente 45 ºC hasta sequedad. Se pesó nuevamente el recipiente con el extracto libre de solvente y se anotó su peso (RB). La diferencia de peso correspondió al contenido total de HTPs o de asfaltenos en mg/kg de suelo seco y se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{HTPs o asfaltenos (mg kg}^{-1}\text{ de s.s.)} = (RB - RA) * (FC) / (P* FH)$$

Donde:

RA= peso en (mg) del recipiente vacío a peso constante.

RB = peso en (mg) del recipiente con el extracto orgánico concentrado.

P= Cantidad de suelo extraído (g)

FH= Factor de correlación de humedad (1 – (%humedad/100))

FC= Factor de corrección para transformar a kg de s.s. = 1000

3.8 Análisis estadístico

Los resultados de producción de CO_2 y biodegradación se presentan como promedios de valores derivados de tres experimentos independientes (triplicados). Las barras de error representan ± desviación estándar de la media. La significancia estadística de estos experimentos se determinó mediante Análisis de Varianza (ANOVA) y test de comparaciones múltiples de Tukey, donde valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Se usó el programa GraphPad - Prism v 8.0.1.

4. Resultados y discusión

4.1 Aislamiento e identificación de microorganismos nativos degradadores de crudo pesado

A partir del suelo contaminado con petróleo crudo se obtuvo un total de 22 aislados bacterianos con la capacidad para crecer utilizando petróleo crudo pesado como única fuente de carbono. Las morfologías de cada uno de los aislados obtenidos se describen en la Tabla 2. Se aisló un total de 13 bacterias Gram positivas y 9 bacterias Gram negativas con diferentes morfologías macroscópicas y microscópicas, entre estas, la formación de colonias cerebrudiformes, producción de pigmentos amarillos, naranja, rojo o negro entre, otros (Ver apéndice C). Por otro lado, microscópicamente presentaron características diferentes en cuanto a tamaño, forma y estructuras celulares como formación de estructuras filamentosas tipo *Actinobacterias* y producción de esporas (Ver apéndice D).

El análisis de *BLAST* de las secuencias de ARNr 16S indicó que los aislamientos bacterianos correspondían a 10 géneros bacterianos (*Cellulosimicrobium, Rhodococcus, Paenibacillus, Pseudomonas, Agrobacterium, Bacillus, Tistrella, Rhizobium, Streptomyces* y *Micromonospora*) con valores de similitud genética cercanos a 100% con las secuencias reportados en *GenBank* (Tabla 3). Se encontró que los aislamientos A2 y A3 pertenecen a una misma especie (*Tistrella mobilis*) con un 99% de similitud en sus secuencias ARNr 16S. Además, los aislados PH1, PH2 y PH3D se identificaron como *Rhodococcus qingshengii* con un 99% de similitud en sus secuencias ARNr 16S.

Tabla 2

Descripción morfológica de los aislados obtenidos

Aislado	Características	
	Macroscópicas (Crecimiento en BHI)	**Microscópicas**
AB3	Colonia roja, pequeña, bordes definidos	Bacilos Gram positivos
18S	Colonia crema, pequeña, brillante, borde regular, convexa	Cocos Gram positivos
21S	Colonia blanquecina, mediana, bordes definidos, centro elevado	Bacilos Gram positivos con espora central
PH1	Colonia mediana, crema, borde definido, convexa	Coco-Bacilos Gram positivos
PH2	Colonias pequeñas, blancas, borde definido, convexa	Coco-Bacilos Gram positivos
PH3	Colonias medianas, convexas, blanquecinas, circular, brillantes	Bacilos cortos Gram negativos
PH3D	Colonia mediana, crema (rosada), borde definido, convexa	Coco-Bacilos Gram positivos
PH5	Colonia cerebrudiforme, grande, con borde irregular	Bacilos cortos Gram negativos
PH6	Colonias medianas, convexas, blanquecinas, circular, brillantes	Bacilos Gram negativos
PH7	Colonia blanquecina, grande, cerebrudiforme, forma irregular	Bacilos Gram positivos
A1	Colonia grande, plana, borde irregular	Bacilos Gram negativos cortos
A2	Colonia crema, mediana, mucoide, bordes definidos, brillante, convexa	Bacilos Gram negativos
A3	Colonia crema, pequeña, redonda, centro elevado	Bacilos Gram negativos cortos, gordos
A4	Colonia crema, pequeña, redonda, centro elevado	Bacilos Gram negativos cortos, gordos
A5	Colonia grande, plana, borde irregular	Bacilos Gram negativos cortos
A6	Colonia pequeña, blanquecina, brillante, bordes definidos, convexa	Bacilos Gram negativos
16S *	Mediana, blanca, centro negro, borde irregular	Filamentos Gram positivos
17S *	Blanca, pequeña, filamentos aéreos	Filamentos Gram positivos
19S *	Mediana, blanca, crecimiento radial	Filamentos Gram positivos
23S *	Mediana, naranja, centro negro, opaca, borde definido	Filamentos Gram positivos, esporas pequeñas
26S *	Mediana, marrón, borde definido, incrustada en el agar	Filamentos Gram positivos
27S *	Blanca, Mediana, Radial	Filamentos Gram positivos, esporas medianas en cadena

Nota: * = Se usó el medio sales-almidón-caseína-agar (SCA) para la descripción de características macroscópicas.

Los géneros *Cellulosimicrobium, Rhodococcus, Paenibacillus, Pseudomonas, Agrobacterium, Bacillus, Tistrella, Rhizobium, Streptomyces y Micromonospora* se han aislado y reportado previamente como como bacterias degradadoras de hidrocarburos del petróleo crudo (Nkem *et al*., 2016; Shi *et al.,* 2002; Zhang *et al.*, 2012; Li *et al*., 2013). Sin embargo, este es el primer informe para las especies *Paenibacillus cellulositrophicus, Streptomyces gramineus, S. xiamenensis, S. microflavus* y *S. viridosporus*, en cuanto a la capacidad para utilizar el petróleo crudo pesado como única fuente de carbono. El género *Cellulosimicrobium* se ha aislado de suelo y del alquitrán, demostrando capacidad para biodegradar hidrocarburos del biodiesel (Nkem *et al*., 2016; (Bertel-Sevilla et al., 2020), *Tistrella sp.* se ha aislado de aguas residuales (Shi *et al.,* 2002), lodos de refinería de petróleo (Sekkour, 2019) y muestras de suelo contaminadas con HAPs (H. P. Zhao *et al.*, 2008). Un aislado *Rhizobium* sp. obtenido a partir de suelo contaminado con petróleo mostró capacidad de degradar HAPs en suelos contaminados (X. Zhang *et al.*, 2012) y un aislado *Agrobacterium* sp. demostró capacidad para la biodegradación de 3-hidroxipiridina, en suelos contaminados con petróleo crudo (Zhao *et al*., 2019). Las especies del género *Rhodococcus* presentan un metabolismo versátil y complejo, capaz de utilizar fuentes de carbono diversas, entre ellas los hidrocarburos del petróleo. Por ejemplo, un aislado de *Rhodococcus* sp fue capaz de degradar 65% de petróleo crudo en nueve días, degradando incluso hidrocarburos de cadena larga (Li *et al*., 2013); *Rhodococcus* sp. presentó la capacidad de utilizar diferentes tipos de crudos como única fuente de carbono y de producir biosurfactantes (Pi *et al*., 2017). De igual forma, se informó la producción de biosurfactante por una aislado de *Paenibacillus* (Gudiña *et al*., 2015). Se ha reportado el potencial de este género para biotransformar el crudo pesado en fracciones ligeras, siendo útil para el recobro mejorado de petróleo por microorganismos (Shibulal *et al*., 2017). Diversos aislados de *Streptomyces* sp.

han demostrado capacidad para tolerar y degradar petróleo crudo (Baoune *et al*., 2018). El estudio de un aislado de *Streptomyces* sp. demostró su habilidad para degradar para degradar el petróleo y los PAHs, eliminando el 98,25% del gasóleo, 99,14% del naftaleno y el 17,5% del fenantreno (Balachandran *et al*., 2012). Los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* se han reportado ampliamente como biodegradadores de petróleo crudo. Por ejemplo, dos especies de *Bacillus* aisladas de sitios contaminados con petróleo crudo mostraron la capacidad de biodegradar petróleo crudo a escala de laboratorio y de campo (Raju *et al*., 2017). Una cepa de *Bacillus licheniformis* biodegradó hasta un 66 % de petróleo crudo pesado (Khanpour-Alikelayeh *et al*., 2020). Se registró una degradación del 58% de petróleo crudo por una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de ramnolipidos o de glicerol, como fuentes de carbono alternativas y estimulantes para la producción de ramnolipidos (Zhang *et al.*, 2005). Cepas de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de suelo contaminado con petróleo mostraron capacidad para crecer y biodegradar petróleo crudo (Das & Mukherjee, 2007). El género *Micromonospora* se ha reportado como parte de un consorcio microbiano degradador de hidrocarburos del petróleo junto a los géneros *Pseudomonas, Achromobacter* y *Bacillus*, degradando 82-88% de HTPs en lodo de petróleo y 86-91% en suelo contaminado (Gojgic-Cvijovic *et al*., 2012).

Por otro lado y en contraste con la información registrada en la literatura para la biodegradación del petróleo crudo, la biodegradación de los asfaltenos ha sido muy poco reportada. Hasta el momento, no existen reportes de que los géneros *Cellulosimicrobium, Rhodococcus, Paenibacillus, Agrobacterium, Tistrella, Rhizobium, Micromonospora* estén involucrados en la biodegradación de asfaltenos. Sin embargo, si existen registros para los géneros lo *Pseudomonas* y *Bacillus*. *B. subtilis* y *P. aeruginosa* degradaron 47% y 63% de la

fracción asfalténica, respectivamente, después de 120 días de incubación en suelos contaminados con petróleo crudo (Das & Mukherjee, 2007).

Tabla 3

Identificación BLAST de bacterias nativas aisladas de suelo contaminado con petróleo crudo pesado.

Aislado	Secuencia relacionada más cercana (Número de acceso GenBank)	% de identidad	Filo	Clase
AB3	*Cellulosimicrobium cellulans* cepa CB251 (MT527539.1)	99%	Actinobacteria	Actinobacteria
18S	*Rhodococcus corynebacterioides* cepa 190311L231 (MT225679.1)	98%	Actinobacteria	Actinobacteria
21S	*Paenibacillus cellulositrophicus* cepa KACC 16577 (NZ_CP045295.1)	100%	Firmicutes	Bacilli
PH1	*Rhodococcus qingshengii* cepa 367-6 16S (MT632489.1)	99%	Actinobacteria	Actinobacteria
PH2	*Rhodococcus qingshengii* cepa 367-6 16S (MT632489.1)	99%	Actinobacteria	Actinobacteria
PH3	*Agrobacterium* sp. CGMCC 11546 (CP047388.1)	99%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria
PH3D	*Rhodococcus qingshengii* cepa AF-06-2C (LR216746.1)	99%	Actinobacteria	Actinobacteria
PH5	*Pseudomonas stutzeri* cepa Gr44 (FR667908.1)	99%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria
PH6	*Agrobacterium tumefaciens* cepa RA26 (GQ486033.1)	98%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria
PH7	*Bacillus aerius* cepa *24k* (NR_118439.1)	99%	Firmicutes	Bacilli
A1	*Pseudomonas* sp. cepa LK5P5E (MN491131.1)	99%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria
A2	*Tistrella mobilis* KA081020-065 (NC_017959.1)	100%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria
A3	*Tistrella mobilis* KA081020-065 (NC_017959.1)	99%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria
A4	*Tistrella* sp. Cepa Can-52 (MK503541.1)	100%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria
A5	*Pseudomonas stutzeri cepa* MUGA173 (KJ672355.1)	98%	Proteobacteria	Gammaproteobacteria
A6	*Rhizobium pusense* cepa *36* (MF767517.1)	98%	Proteobacteria	Alphaproteobacteria
16S	*Streptomyces gramineus* cepa SAMC-RUSOL (28)2 (MN606173.1)	99%	Actinobacteria	Actinobacteria
17S	*Streptomyces xiamenensis* cepa 318 (CP009922.3)	98%	Actinobacteria	Actinobacteria
19S	*Streptomyces* sp. Cepa KBR3 (MT577838.1)	100%	Actinobacteria	Actinobacteria
23S	*Micromonospora* sp. 3R008 (LC497886.1)	98%	Actinobacteria	Actinobacteria
26S	*Streptomyces microflavus* cepa SaMo-2 (MZ618727.1)	99%	Actinobacteria	Actinobacteria
27S	*Streptomyces viridosporus* T7A cepa ATCC 39115 (CP023700.1)	99%	Actinobacteria	Actinobacteria

Nota: El análisis se hizo de las secuencias del gen ARNr 16S de cada uno de los aislados.

Dos aislados de *P. aeruginosa* degradaron asfaltenos puros con una eficiencia aproximada del 10%, la cual aumentó a 59 y 72% en presencia de las demás fracciones del petróleo crudo (Gao

et al., 2017). Un consorcio conformado por un aislado de *Pseudomonas* sp. y cinco aislados de *Bacillus* sp. logró biodegradar el 48% de asfaltenos durante 60 días (Tavassoli *et al*., 2012).

4.2 Construcción del consorcio microbiano degradador

4.2.1 Evaluación de la tolerancia a asfaltenos puros

Los asfaltenos son la fracción más recalcitrante del petróleo crudo debido principalmente a su compleja estructura molecular. Los asfaltenos contienen diversos núcleos de HAPs fusionados, los cuales presentan propiedades mutagénicas, cancerígenas, teratogénicas e inmunotóxicas para los organismos vivos, incluidos los microorganismos, animales y seres humanos. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, los HAPs son contaminantes altamente hidrófobos, favoreciendo la absorción y acumulación de varios productos tóxicos e intermediarios activos de su metabolismo en diversos organismos (Patel *et al*., 2020). Las bacterias presentan mecanismos de resistencia a la HAPs los cuales incluyen la biotransformación de compuestos tóxicos a menos tóxicos, rigidez de la pared celular, impermeabilización de la superficie celular, presencia de bombas de eflujo, patrones proteicos diferenciados y síntesis de proteínas específicas de tolerancia, entre otros (Ramos *et al*., 2002; Torres *et al*., 2011).

Por otro lado, los microorganismos expuestos a los asfaltenos además se enfrentan al reto de tolerar los metales pesados tóxicos presentes en las moléculas de los asfaltenos (Chinedu & Chukwuemeka, 2018). Se han estudiado las diversas formas en las cuales los microorganismos pueden tolerar la toxicidad por metales, entre ellas se encuentran, el secuestro de metales tóxicos por la pared celular o por proteínas intracelulares, (tales como las metalotioneínas), la alteración de vías bioquímicas para el bloqueo de la absorción de metales, la conversión enzimática de metales a formas inocuas, la reducción de la concentración intracelular mediante sistemas de

eflujo, entre otros. Sin embargo, la capacidad de tolerancia es intrínseca de cada microorganismo (Ojuederie & Babalola, 2017).

En el presente estudio se midió la capacidad de los 22 aislados obtenidos para tolerar los asfaltenos mediante ensayos de placa de superficie (Tabla 4). El aislado *Micromonospora* sp. 23S mostró ser el menos tolerante debido a que no presentó crecimiento a la concentración más baja de asfaltenos probada (100 ppm). Sin embargo, la mayoría de los aislados lograron tolerar concentraciones altas de asfaltenos puros. 13 de ellos soportaron una concentración máxima de hasta 6.000 ppm y 8 cepas consiguieron tolerar concentraciones extremas de hasta 60.000 ppm. Adicionalmente, el aislado *B. aerius* PH7 mostró mayor crecimiento radial a medida que aumentaba la concentración de asfaltenos en el medio hasta una concentración de 20.000 ppm (Ver apéndice E).

Existen reportes en la literatura en cuanto a ensayos de tolerancia al petróleo crudo extrapesado. Por ejemplo, el hongo P. palmarum mostró la capacidad para crecer y tolerar concentraciones de 50.000 ppm de petróleo crudo extrapesado (Naranjo-Briceño et al., 2013). Sin embargo, el presente estudio es el primer trabajo en donde se reportan pruebas de tolerancia a asfaltenos. Las características de tolerancia a asfaltenos estudiadas en este trabajo son cruciales para la selección de microorganismos útiles para la biodegradación de asfaltenos y petróleo crudo pesado, dado que revelan el alto potencial de biodegradación de los aislados obtenidos, basados en el hecho de que en suelo se enfrentan a compuestos orgánicos con toxicidad elevada que deben utilizar como fuente de carbono y energía (Ramos et al., 2002).

Tabla 4

Pruebas de tolerancia a asfaltenos puros en placa.

	Concentración de asfaltenos en el medio (ppm)									
Aislado	**Control**	**100**	**600**	**1.000**	**3.000**	**6.000**	**8.000**	**10.000**	**20.000**	**60.000**
AB3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PH1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PH3D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PH5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PH6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PH7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16S	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
17S	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
19S	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
23S	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26S	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
27S	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Nota: Los medios fueron monitoreados por dos semanas. El crecimiento microbiano para la concentración más elevada se observó al día cinco de incubación. Se usó medio BHI como base. + = Crecimiento. - = No crecimiento.

La falta de tolerancia de las poblaciones degradantes es un factor que contribuye a la persistencia de HTPs en suelos contaminados, como consecuencia de un crecimiento y metabolismo inhibido (Zafra *et al*., 2013). En este sentido, los aislados *R. corynebacterioides* 18S, *P. cellulositrophicus* 21S, *C. cellulans* AB3, *R. gingshengii* PH3D, *P. stutzeri* PH5, *B. aerius* PH7, quienes presentaron la mayor tolerancia a los asfaltenos (60.000 ppm), se eligieron

para continuar con las pruebas de selección para la conformación del consorcio microbiano degradador.

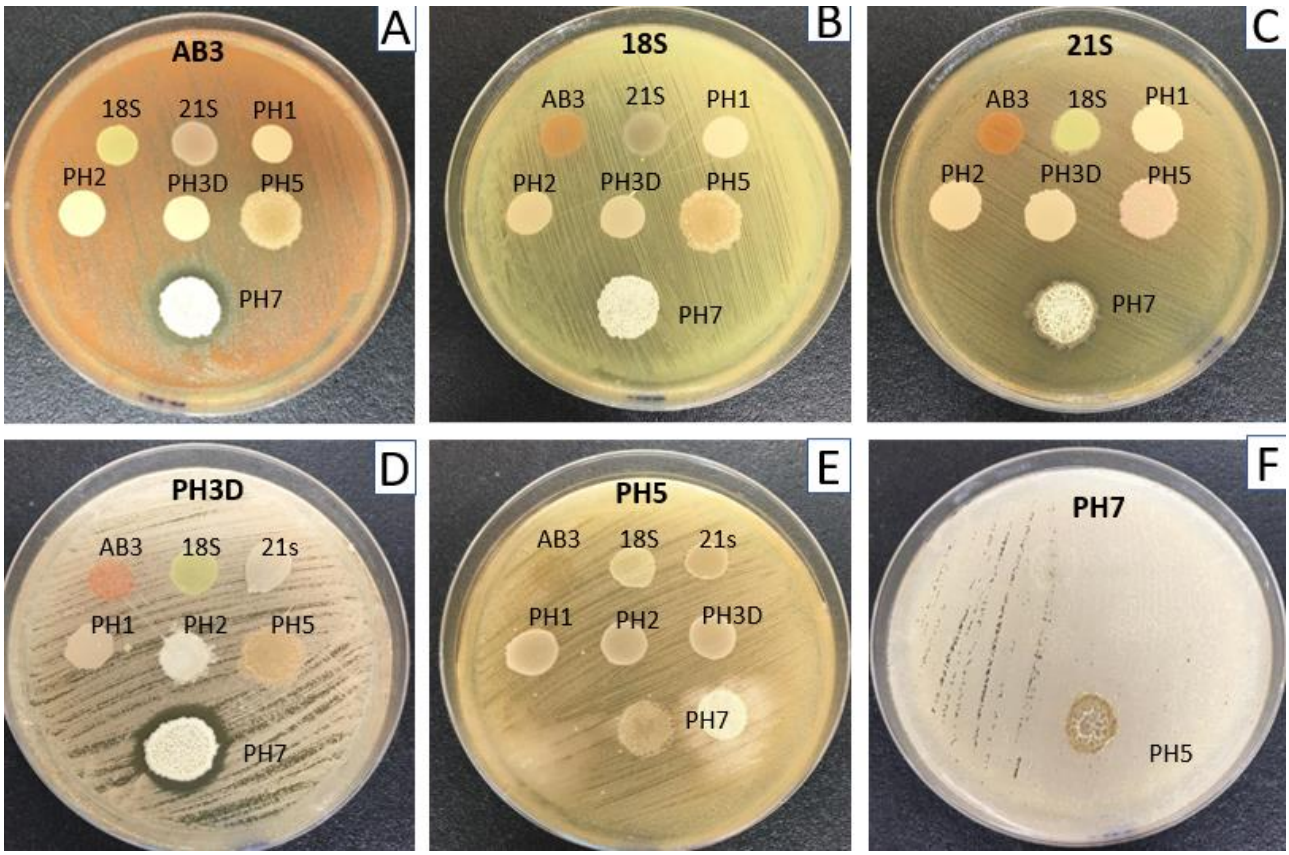
4.2.2 Evaluación del antagonismo microbiano

Las comunidades microbianas en diversos hábitats forman uniones cooperativas que resultan en un beneficio directo o indirecto para los microorganismos involucrados. Sin embargo, a su vez se encuentran en una competencia constante de supervivencia por espacio y recursos (Hibbing *et al.*, 2010). El diseño de consorcios microbianos optimizados para aplicaciones de biorremediación se debe tener en cuenta estas interacciones, de tal modo que se facilite el trabajo de las comunidades microbianas responsables de la biodegradación y se evite la inhibición entre los microorganismos pertenecientes al consorcio (Freilich *et al.*, 2011). Es por esto por lo que el uso de microorganismos compatibles, es decir que no presenten inhibición microbiana entre sí, es de gran importancia para establecer consorcios estables, eliminando problemas asociados a la inhibición microbiana. Los resultados de las pruebas de antagonismo microbiano mostraron los efectos inhibitorios del aislado *B. aerius* PH7 hacia los aislados *C. cellulans* AB3 y *R. gingshengii* PH3D (Fig. 2. A y D). Además, el aislado *B. aerius* PH7 mostró efecto de inhibición por velocidad decrecimiento hacia los aislados *R. corynebacterioides* 18S y *P. cellulositrophicus* 21S (Fig. 2. F). *Bacillus* es un género microbiano ampliamente reconocido por su capacidad para producir compuestos antimicrobianos que presentan un amplio espectro de actividad antibiótica, por lo cual diversas especies se han reportado en la literatura. Por ejemplo, un asilado de *B. aerius* que presentó inhibición frente a *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* (Galaviz-Silva *et al*., 2012) o *Bacillus subtilis* productor de surfactina con actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* (Liu *et al.*, 2012).

El aislado *B. aerius* PH7 se eliminó como parte del consorcio debido a que presentó inhibición frente a los demás aislados. Sin embargo, se resaltan sus características de tolerancia a asfaltenos y su potencial de biodegradación individual, el cual puede ser analizado en estudios posteriores.

Figura 2

Evaluación del Antagonismo microbiano simultaneo entre los aislados más tolerantes a asfaltenos



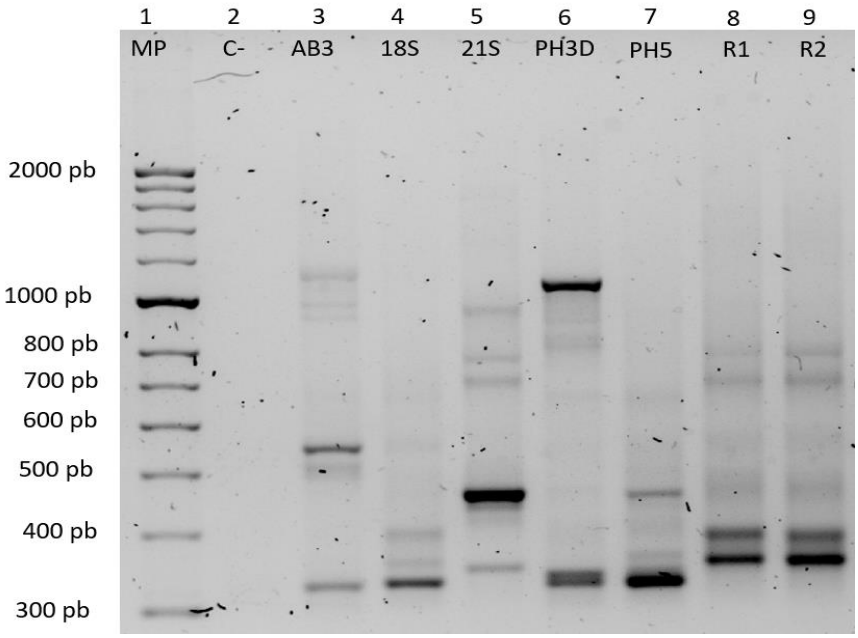
Microorganismo sembrado de forma masiva en medio BHI: **A**. Aislado AB3. **B.** Aislado 18S**. C.** Aislado 21S. **D**. Aislado PH3D. **E.** Aislado PH5. **F.** Aislado PH7.

4.2.3 Prueba de selección inducida en suelo

Después de los 30 días de incubación de los 5 aislados inoculados en suelo contaminado con 5.000 ppm de asfaltenos, se logró identificar la presencia de los 5 aislados en el suelo, demostrándose la capacidad de estas cepas para permanecer por largos periodos de tiempo en suelos contaminados con asfaltenos.

Figura 3

Perfil LSSP-PCR de los aislados individuales y de los reactores después de 30 días de incubación en suelo contaminado con asfalteno puro.



Carril 1= Marcador de peso molecular. Carril 2= Control negativo. Carriles 3,4,5,6 y 7= Perfil LSSP de los aislados AB3, 18S, 21S, PH3D y PH5 respectivamente. R1=Perfil del Reactor 1 (Replica 1). R2= Perfil del reactor 2 (Replica 2).

Para el monitoreo de los aislados supervivientes se generó un perfil de bandas específico para cada aislado inoculado mediante la técnica LSSP-PCR (Fig. 3). Estos perfiles se relacionaron con el perfil generado en los biorreactores tras los 30 días de incubación (Fig. 3. Carril del 8 y 9). Se observaron dos bandas de aproximadamente 804 y 720 pb específicas del aislado 21S, una banda de 550 pb específica del aislado AB3, una banda de aproximadamente 400 pb específica para el aislado 18S. No se observaron bandas específicas para los aislados PH5 y PH3D. No obstante, los datos fueron confirmados mediante el aislamiento de los microorganismos inoculados después de 30 días de incubación, siendo consistente con los resultados de LSSP-PCR, y detectando la presencia de los aislados PH5 y PH3D en menor abundancia (Apéndice F). Aunque la técnica LSSP-PCR no es cuantitativa, al relacionarse con los resultados obtenidos a partir del aislamiento de los microorganismos inoculados, se observa una relación entre la abundancia del aislado en el suelo y la abundancia de la banda especifica en los resultados de la LSSP-PCR. Esto se debe a que, al existir una mayor abundancia de un microorganismo en el suelo, mayor es la cantidad de ADN extraído que posteriormente se usa como molde para la prueba LSSP-PCR.

El monitoreo por LSSP-PCR, complementado con el aislamiento de los microorganismos, mostró que todos los aislados inoculados sobrevivieron al proceso de selección en suelo y prevalecieron por lo menos hasta el día 30 (Fig. 3), siendo los aislados *R. corynebacterioides* 18S y *P. cellulositrophicus* 21S los más abundantes. Con base en estos resultados se estableció la combinación de microorganismos que conformaron el consorcio microbiano, que finalmente contenía a *R. corynebacterioides* 18S, *P. cellulositrophicus* 21S, *C. cellulans* AB3, *R. gingshengii* PH3D, *P. stutzeri* PH5.

4.3 Biodegradación de crudos pesados y asfaltenos en suelos

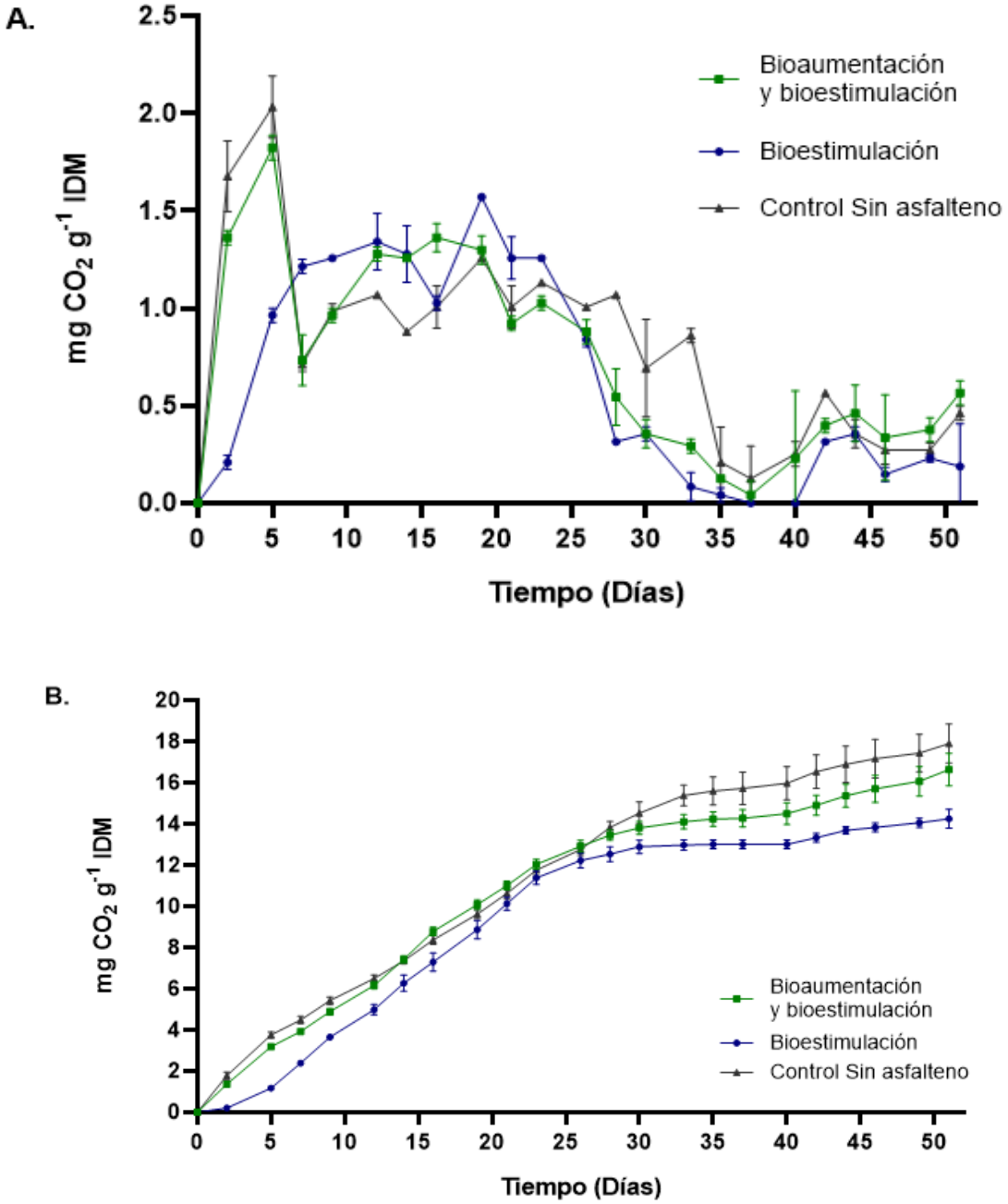
4.3.1 Actividad respiratoria microbiana durante la biodegradación

Los resultados del crecimiento microbiano indicaron una actividad microbiana constante a lo largo del experimento tanto en los biorreactores contaminados como en los biorreactores no contaminados. Durante la biodegradación de la fracción de asfaltenos se evidenció al día 52 una producción significativamente menor de CO_2 en los biorreactores tratados únicamente con bioestimulación, comparados con el control sin asfaltenos (p = 0.02) y con los biorreactores tratados con bioaumentación y bioestimulación (p = 0,03) (Fig. 4), indicando baja adaptación de los microorganismos nativos del suelo a la presencia de concentraciones altas de asfaltenos. La bioestimulación parece no ser suficiente para garantizar el adecuado crecimiento microbiano en suelos contaminados con asfaltenos.

La producción de CO_2 al día 52 en los biorreactores con asfaltenos tratados con bioaumentación y bioestimulación comparados con el control sin asfaltenos no presentó diferencias estadísticamente significativas (p = 0,2913) (Fig. 4). Sin embargo, la producción de CO_2 en el control se debe a que los microorganismos utilizaron los nutrientes presentes en el suelo, como lo son los ácidos húmicos, materia orgánica en descomposición, micronutrientes y nutrientes agregados en la bioestimulación. En cambio, la producción de CO_2 en los tratamientos bioaumentados y bioestimulados pudo ocurrir a partir del uso de los asfaltenos como fuente de carbono además de los nutrientes presentes en el suelo. Por tanto, estos resultados sugieren adaptabilidad y supervivencia del consorcio en presencia de concentraciones elevadas de asfaltenos en el suelo durante los 52 días del experimento.

Figura 4

Producción de CO_2 durante la biorremediación de suelo contaminado con 10.000 ppm de asfalteno puro



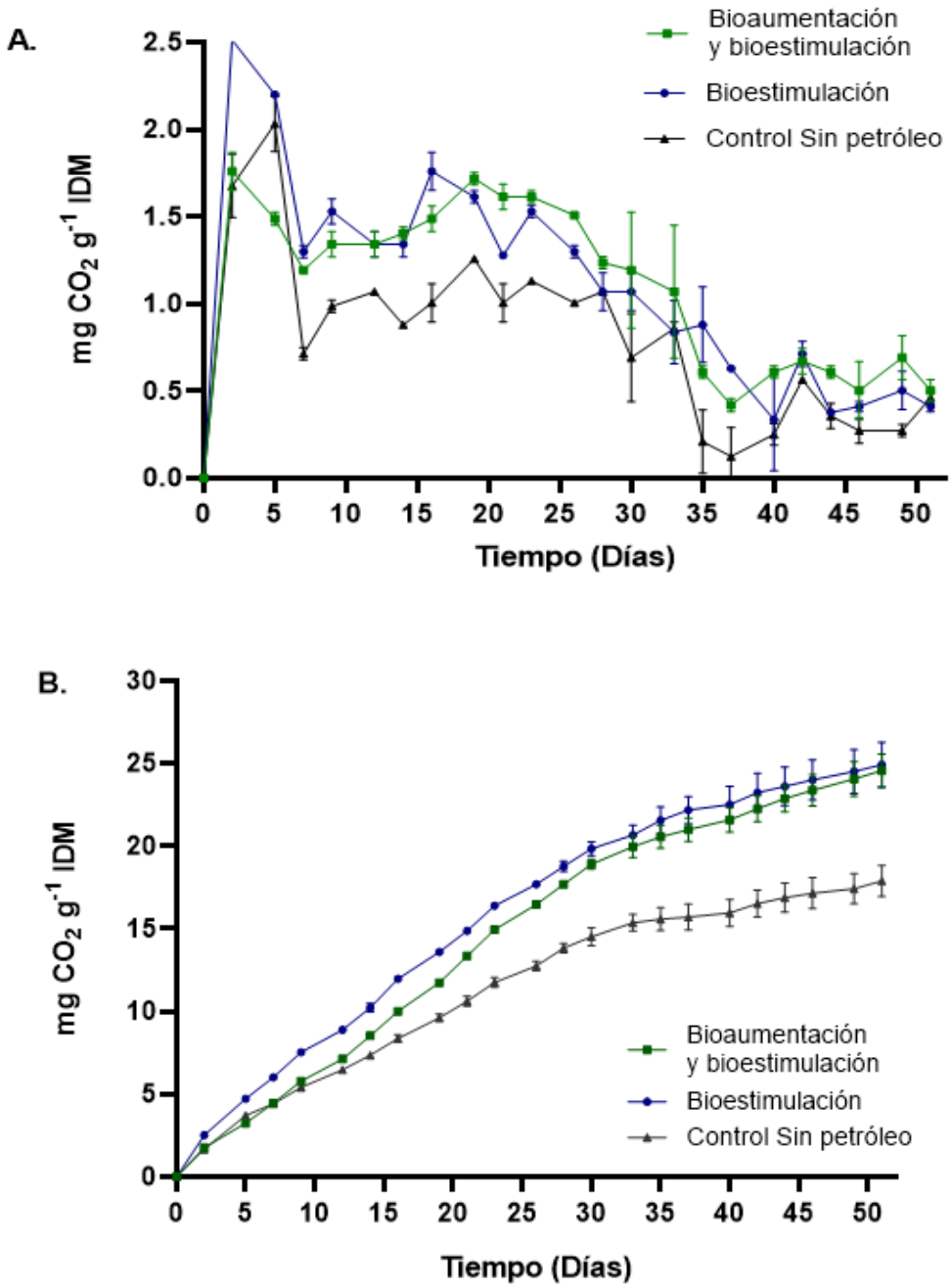
A. Producción de CO_2 diario. B. CO_2 acumulado.

Por otro lado, durante la biodegradación del petróleo crudo pesado, los biorreactores produjeron un pico de CO_2 inicial al día 5, el cual disminuyó al día 7. Se evidenció una menor disminución en los biorreactores con petróleo crudo pesado tratados y se mantuvieron produciendo significativamente más CO_2 hasta el día 30 de incubación, comparado con el biorreactor control (Fig. 5 A). Cuando se analiza la gráfica de CO_2 acumulado, se evidencia una mayor producción de CO_2 al día 52 en los biorreactores tratados con bioaumentación y bioestimulación y los biorreactores únicamente bioestimulados comparados con el control no contaminado ($p < 0{,}0024$ y $p < 0{,}0058$ respectivamente) (Fig. 5 B). Este aumento en la producción de CO_2 sugiere una asociación con la biodegradación del petróleo crudo, en donde los hidrocarburos del petróleo crudo sirven como fuente de carbono adicional para los microorganismos que presenten la capacidad para biodegradarlos.

Por último, la producción de CO_2 en los reactores contaminados con asfaltenos no fue tan elevada como la producción en los reactores contaminados con petróleo crudo pesado. No obstante, se debe a que en los reactores contaminados con petróleo crudo pesado hay presencia de fracciones más simples como los saturados, los cuales son fácilmente mineralizados, es decir, llevados a CO_2 y H_2O; en cambio, los asfaltenos puros son moléculas complejas que requieren de diversos pasos para su mineralización total y durante su biodegradación no solo se produce CO_2, sino que el carbono resultante se puede utilizar para la producción de biomasa bacteriana.

Figura 5

Producción de CO_2 durante la biorremediación de suelo contaminado con 10.000 ppm de petróleo crudo pesado



A. Producción de CO_2 diario. B. CO_2 acumulado.

4.3.2 Eficiencia de la biodegradación de asfaltenos y petróleo crudo pesado

Los resultados de biodegradación mostraron que después de 52 días de incubación, el 83,33% de los asfaltenos y el 64% de petróleo crudo pesado se biodegradadaron en los biorreactores inoculados con el consorcio bacteriano. Se evidenció una eficiencia de degradación de asfaltenos significativamente mayor ($p < 0,004$) en los biorreactores bioaumentados y bioestimulados comparado con los biorreactores tratados únicamente por bioestimulación en los que se biodegradó 68% de asfaltenos (Fig. 6). Por otro lado, los resultados de biodegradación de petróleo crudo pesado tratados con bioaumentación y bioestimulación, al igual que los reactores contaminados con asfaltenos, evidenciaron una eficiencia de biodegradación de petróleo crudo pesado significativamente mayor ($p < 0,004$) comparado con los controles únicamente bioestimulados en los que se biodegradó el 33% de petróleo crudo pesado (Fig. 7).

Se evidencia una mayor biodegradación de los asfaltenos puros comparado con la biodegradación del petróleo crudo por el consorcio. Esto puede deberse a la preferencia de biodegradación de asfaltenos por el consorcio microbiano debido a que, las estrategias utilizadas en el presente estudio para la conformación del consorcio se basaron en la tolerancia y estabilidad frente a concentraciones elevadas de asfaltenos. En la literatura se ha reportado este tipo de preferencia hacia fracciones pesadas. Por ejemplo, un aislado identificado como *Garciaella petrolearia* evidenció preferencia por la fracción asfalténica, degradando 55% de esta, en comparación con la fracción alifática, la cual se degradó el 25% (Lavania *et al*., 2012). Lo anterior, se encuentra acorde los resultados obtenidos en este trabajo, teniendo en cuenta que el consorcio se seleccionó para la biodegradación de la fracción más recalcitrante del petróleo

crudo pesado. Por otro lado, los resultados de biodegradación del petróleo crudo pesado pueden encontrarse subestimados al no haberse obtenido un 100 % de extracción de petróleo en los controles de extracción, posiblemente debido a la evaporación de fracciones volátiles como los hidrocarburos saturados.

A pesar de que el petróleo crudo y los asfaltenos son hábitats hostiles para los microorganismos, existe evidencia de que sirven como reservorio de microorganismos con gran potencial biotecnológico (Cai *et al.,* 2015). La bioestimulación proporciona los nutrientes necesarios para que dichos microorganismos puedan mejorar las tasas de biodegradación (Tyagi *et al.,* 2011). Sin embargo, al combinarla con la bioaumentación se ha observado mejora significativamente los resultados de biorremediación (Varjani & Upasani, 2019), lo cual, se encuentra acorde con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Diversos estudios han reportado la biodegradación de asfaltenos en medios líquidos a diversas concentraciones iniciales desde 1.000 ppm hasta 5.000 ppm (Tavassoli et al., 2012; Uribe-Alvarez et al., 2011). Además la biodegradación de asfaltenos se evalúa en presencia de las demás fracciones del petróleo. Por ejemplo, la biodegradación de asfaltenos por un consorcio microbiano fue de 46,41% en medio líquido contaminado con petróleo crudo *(Shahebrahimi et al*., 2020). Pourfakhraei y colaboradores reportaron un 88.7% de biodegradación de asfaltenos en medio liquido Czapeck con petróleo crudo pesado como única fuente de carbono (Pourfakhraei et al., 2018). Por otro lado, el mayor reporte en la literatura de biodegradación de asfaltenos puros por un consorcio microbiano en medio liquido es del 75% (Zargar et al., 2021).

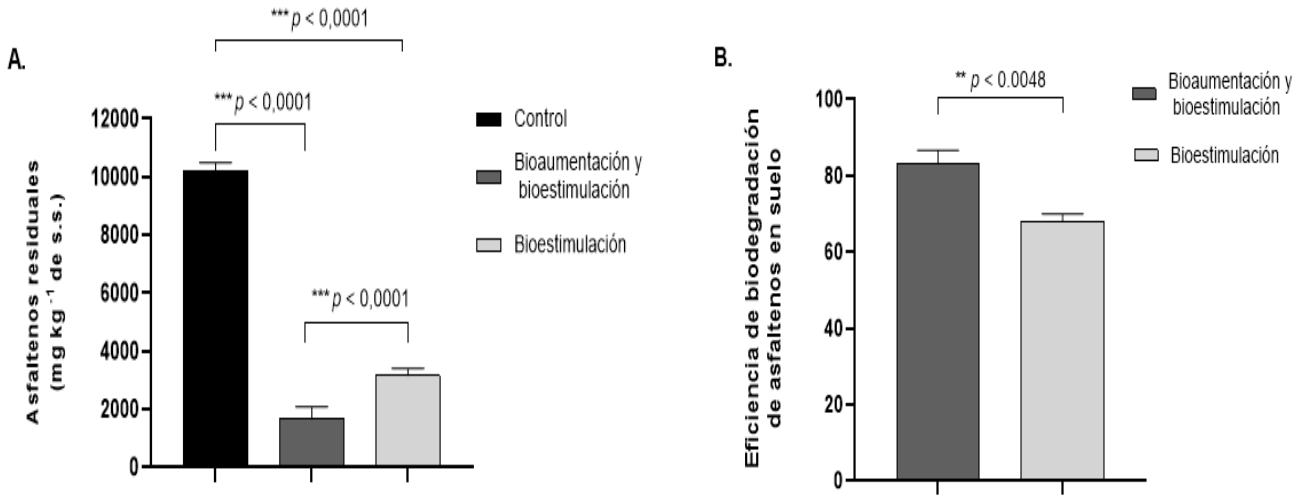
En el suelo los asfaltenos pueden adsorber materia organomineral para convertirse en compuestos mucho más recalcitrantes y poco biodisponibles para los microorganismos. Existen

pocos reportes de biodegradación de esta fracción en suelo. Yanto y Tachibana en el 2014 estudiaron la biodegradación de asfaltenos en suelo, reportando una eficiencia de degradación de asfaltenos del 19,2% a una concentración de 30.000 mg kg^{-1} de suelo; eficiencia que incluso añadiendo nutrientes no mejoró significativamente (Yanto & Tachibana, 2014a). Además, un co-cultivo de hongos *Pestalotiopsis* sp. y *Polyporus* sp. degradó el 79,31 % de asfaltenos en suelo contaminado con petróleo crudo (Yanto & Tachibana, 2014b).

El presente estudio es el mayor reporte de eficiencia de biodegradación de asfaltenos puros en suelos por un consorcio microbiano a concentraciones elevadas de contaminación (10.000 ppm).

Figura 6

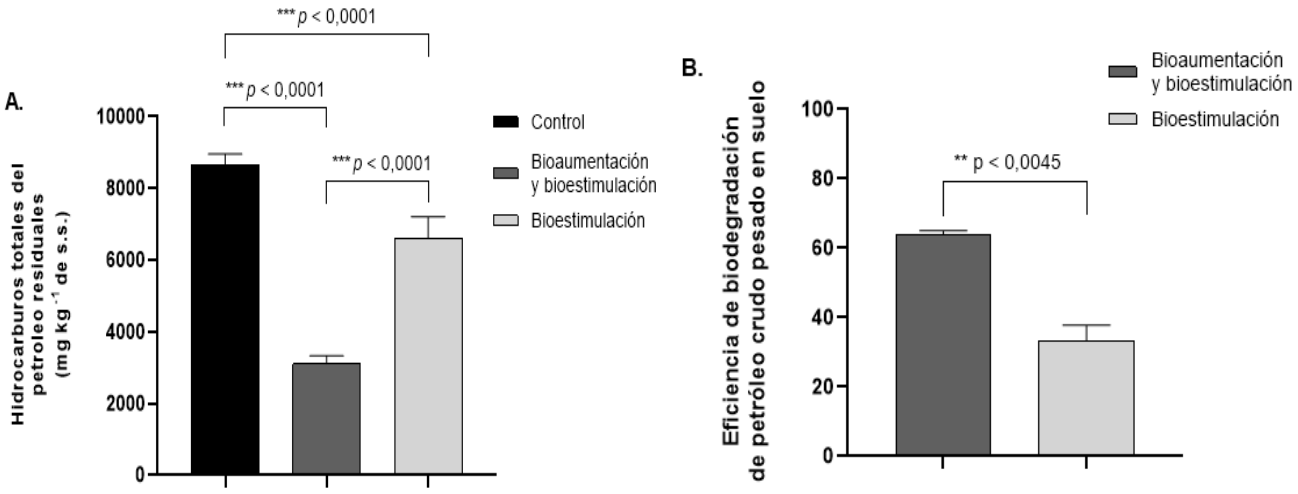
Biodegradación de asfaltenos después de 52 días de incubación.



A. Concentración de Asfaltenos residuales (mg Kg^{-1}). B. Eficiencia de biodegradación de asfaltenos (%).

Figura 7

Biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo después de 52 días de incubación.



A. Concentración de HTPs residuales (mg Kg $^{-1}$). B. Eficiencia de biodegradación de HTPs (%).

Diversos estudios indican que los aislados que conforman el consorcio bacteriano descrito en este trabajo poseen capacidades para la degradación de hidrocarburos, entre ellas, la producción de enzimas degradativas como la alcano hidroxilasa, alcohol deshidrogenasa y la lacasa por *P. stutzeri* (Parthipan *et al.*, 2017). Adicionalmente, la presencia de genes necesarios para la síntesis de proteínas involucradas en la degradación del benzoato y la secreción de tipo I, que podrían transportar enzimas y biosurfactantes (Hu *et al*., 2015). Por otro lado, un aislado de *P. stutzeri* presentó niveles altos de tolerancia a mezclas de HAPs de bajo y alto peso molecular, llegando a degradar HAPs de tres anillos como el fluoreo y fenantreno (Rabodonirina *et al.,* 2019). *Cellulosimicrobium cellulans* es una actinobacteria capaz de producir un sistema enzimático hemicelulolítico extracelular, con actividad de hemicelulasas, exoglicanasas, xilanasas, mananasas, peptidasas y lacasas (Wang *et al.,* 2018). Se ha reportado que el sistema enzimático

de *C. cellulans* exhibe una afinidad fuerte de unión a sustratos insolubles en agua (Dou *et al*., 2019b). El género *Rhdococcus* posee un gran potencial metabólico para la degradación de diversos contaminantes, incluidos aquellos compuestos recalcitrantes y de extrema toxicidad, como lo son compuestos halogenados y nitrosustituidos, aromáticos heterocíclicos y policíclicos (Larkin *et al.,* 2005). Un aislado de *R. qingshengii* codifica en su genoma múltiples enzimas para la degradación de compuestos, alcano-1 monooxigenasas e hidroxilasas del citocromo P450, homogentisato 1,2-dioxigenasa, fumarilacetoacetasa, 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa; enzimas de vías de deshalogenación como deshalogenasas de halo ácidos de tipo II y enzimas de la vía de desulfuración del dibenzotiofeno, como la enzima B de desulfuración del dibenzotiofeno (Lincoln *et al.,* 2016). Además, se ha reportado la capacidad para la acumulación de metales como el cesio por un aislado de *R. qingshengii* (Satoh *et al.,* 2020), mecanismo que puede ser clave durante la biodegradación de asfaltenos dado que, estos presentan metales pesados en su estructura.

Existen reportes de aislados de *Paneibacillus* sp. con capacidad para degradar hidrocarburos del petróleo. Por ejemplo, Mesbaiah *et al*. (2016) reportaron la capacidad de un aislado de *Paenibacillus popilliae* de crecer en petróleo crudo o HAPs como única fuente de carbono (Mesbaiah *et al.,* 2016). Sin embargo, el presente estudio reporta por primera vez la capacidad de *P. cellulositrophicus* para degradar asfaltenos en suelo y utilizar el petróleo crudo pesado como única fuente de carbono. Se sabe que *P. cellulositrophicus* es una bacteria celulítica capaz de producir celulasa extracelular (Rohman *et al*., 2016) y que diferentes microorganismos han mostrado excelente potencial para degradar asfaltenos mediante la producción de enzimas

extracelulares (Cerniglia C. E., 2010; Zhang *et al*., 2016), por lo cual la celulasa extracelular producida por *P. cellulositrophicus* puede estar involucrada en la degradación de los asfaltenos

La hidrofobicidad es uno de los factores que influye negativamente en los procesos de biodegradación de los asfaltenos, dado que limita su biodisponibilidad (Semple *et al.*, 2003). No obstante, la producción de biosurfactantes es un mecanismo clave para solventar este inconveniente. Se ha reportado por diversos autores la capacidad de *P. stutzeri* (Fan *et al*., 2017; Zhao *et al.,* 2018) y el género *Paenibacillus* para la producción de potentes biosurfactantes (Bezza & Nkhalambayausi Chirwa, 2015; Jimoh & Lin, 2019). Por otro lado, existen diversos mecanismos que presentan gran importancia en la digestión de sustratos insolubles que pueden ser clave para la biodegradación de asfaltenos y petróleo crudo pesado. Por ejemplo, se observó la producción de una capa gruesa de exopolisacáridos de tipo curdlan que ayuda a la adhesión de *C. cellulans* a sustratos insolubles (Dou *et al.,* 2019a); se evidencio la presencia de genes involucrados en la biosíntesis de exopolisacáridos en el genoma de un asilado de *R. qingshengii*, que de igual manera, estarían involucrados a la solubilización de los hidrocarburos y la formación de flóculos de células que permitirían un mayor contacto con el sustrato (Lincoln *et al.,* 2016).

Teniendo en cuenta los mecanismos anteriormente mencionados y los reportes de biodegradación de asfaltenos, el consorcio establecido en el presente estudio demuestra una elevada eficiencia de biodegradación de asfaltenos y petróleo crudo pesado en suelo y junto al poco tiempo de incubación, extrema tolerancia, compatibilidad y estabilidad en suelos contaminados, representan una ventaja clara frente a otros estudios reportados para el uso de

consorcios microbianos en estrategias reales de biorremediación de suelos contaminados a escala de campo. Además, este es el primer reporte de los microorganismos *P. cellulositrophicus*, *Streptomyces gramineus*, *S. xiamenensis*, *S. microflavus* y *S. viridosporus* involucrados en la biodegradación del petróleo crudo pesado y de *P. cellulositrophicus* para biodegradar asfaltenos en suelo, lo que los hace útiles para posteriores trabajos relacionados con el metabolismo de degradación de petróleo crudo y asfaltenos.

5. Conclusiones

Se aislaron e identificaron un total de 22 cepas bacterianas nativas con la capacidad para utilizar el petróleo crudo pesado como única fuente de carbono y que presentan niveles de tolerancia extrema hacia asfaltenos. De los cuales, se reportó por primera vez la capacidad de un aislado de *P. cellulositrophicus, Streptomyces gramineus, S. xiamenensis, S. microflavus* y *S. viridosporus* para biodegradar petróleo crudo pesado y de *P. cellulositrophicus* para biodegradar asfaltenos en suelo. Estos aislados son potencialmente útiles para futuros estudios y generación de estrategias o productos adecuados para la biorremediación de suelos impactados con petróleos pesados.

Se construyó un consorcio microbiano degradador de asfaltenos y petróleo crudo pesado en suelos, conformado por los aislados *R. corynebacterioides* 18S, *P. cellulositrophicus* 21S, *C. cellulans* AB3, *R. gingshengii* PH3D, *P. stutzeri* PH5, con un alto potencial para la biorremediación de suelos impactados con petróleo crudo pesado y extrapesado, debido a su tolerancia y capacidad elevada para biodegradar asfaltenos.

La eficiencia de biodegradación de asfaltenos y de crudo pesado en suelo por el consorcio microbiano fue de 83% y 64% respectivamente, lo cual demuestra que el consorcio construido es eficiente y presenta potencial para ser utilizado en procesos de biorremediación en escala real utilizando concentraciones de asfaltenos y crudo pesado elevadas.

Referencias Bibliográficas

Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, *25*(1), 107–123. https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011

Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., & Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmention: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, *3*(1), 28–39. https://doi.org/10.12691/ijebb-3-1-5

Al-Hawash, A. B., Dragh, M. A., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H. A., Zhang, X., & Ma, F. (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, *44*(2), 71–76. https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001

Al-Saleh, E., & Hassan, A. (2016). Enhanced crude oil biodegradation in soil via biostimulation. *International Journal of Phytoremediation*, *18*(8), 822–831. https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1146223

Azubuike, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*(11). https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x

Balachandran, C., Duraipandiyan, V., Balakrishna, K., & Ignacimuthu, S. (2012). Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresource Technology*, *112*, 83–90. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.059

Baoune, H., Ould El Hadj-Khelil, A., Pucci, G., Sineli, P., Loucif, L., & Polti, M. A. (2018). Petroleum degradation by endophytic *Streptomyces* spp. isolated from plants grown in contaminated soil of southern Algeria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *147*(May 2017), 602–609. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.013

Bertel-Sevilla, A., Cervantes-Ceballos, L., Tirado-Ballestas, I., Maldonado-Rojas, W., Alzate-Restrepo, J., & Olivero-Verbel, J. (2020). Biodegradation of biodiesel-oil by Cellulosimicrobium sp. Isolated from Colombian Caribbean soils. *Environmental Technology (United Kingdom)*, *41*(18), 2337–2349. https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1564798

Boratyn, G. M., Camacho, C., Cooper, P. S., Coulouris, G., Fong, A., Ma, N., Madden, T. L., Matten, W. T., McGinnis, S. D., Merezhuk, Y., Raytselis, Y., Sayers, E. W., Tao, T., Ye, J., & Zaretskaya, I. (2013). BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*, *41*(Web Server issue), 29–33. https://doi.org/10.1093/nar/gkt282

Brown, D. M., Bonte, M., Gill, R., Dawick, J., & Boogaard, P. J. (2017). Heavy hydrocarbon fate and transport in the environment. *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology*, *50*(3), 333–346. https://doi.org/10.1144/qjegh2016-142

Castellanos, M. L., Isaza, R. J., & Torres, J. M. (2015). *Evaluation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in urban soil from Maicao , Colombia*. *281*.

Cerniglia C. E., S. J. B. (2010). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi. In *Degradation of Plycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi* (pp. 2080–2101). https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4

Chacón-Patiño, M. L., Rowland, S. M., & Rodgers, R. P. (2017). Advances in Asphaltene

Petroleomics. Part 1: Asphaltenes Are Composed of Abundant Island and Archipelago Structural Motifs. *Energy and Fuels*, *31*(12), 13509–13518. https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b02873

Chan Quijano, J. G., Jarquín Sánchez, A., Ochoa Gaona, S., Martínez Zurimendi, P., López Jiménez, L. N., & Lázaro Vázquez, A. (2015). Directrices para la remediación de los suelos contaminados con hidrocarburos. *Teoría y Praxis*, *11*(17), 123–144. https://doi.org/10.22403/uqroomx/typ17/05

Chikere, C. B., Surridge, K., Okpokwasili, G. C., & Cloete, T. E. (2012). Dynamics of indigenous bacterial communities associated with crude oil degradation in soil microcosms during nutrient-enhanced bioremediation. *Waste Management and Research*, *30*(3), 225–236. https://doi.org/10.1177/0734242X11410114

Chinedu, E., & Chukwuemeka, C. K. (2018). Oil spillage and heavy metals toxicity risk in the Niger Delta, Nigeria. *Journal of Health and Pollution*, *8*(19). https://doi.org/10.5696/2156-9614-8.19.180905

Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, *98*(7), 1339–1345. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.032

Dong, Y., Lang, Z., Kong, X., Lu, D., & Liu, Z. (2015). Kinetic and multidimensional profiling of accelerated degradation of oil sludge by biostimulation. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, *17*(4), 763–774. https://doi.org/10.1039/c4em00428k

Ecopetrol S.A. (2018). *Reporte Integrado de Gestión Sostenible 2018*. Revisado: Marzo 2021:

https://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/Home/es/ResponsabilidadEtiqueta/InformesGestionSostenibilidad/Informesdegestio

Ecopetrol S.A. (2019). *Reporte integrado de gestion sostenible 2019*. Revisado: Marzo 2021: https://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/Home/es/ResponsabilidadEtiqueta/InformesGestionSostenibilidad/Informesdegestio

Ecopetrol S.A. (2020). *Reporte Integrado de Gestión Sostenible 2020*. Revisado: Marzo 2021: https://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/Home/es/ResponsabilidadEtiqueta/InformesGestionSostenibilidad/Informesdegestio

Fernández Linares, L. C., Rojas Avelizapa, N. G., Roldán Carrillo, T. G., Ramírez Islas, M. E., Zegarra Martínez, H. G., Uribe Hernández, R., Reyez Ávila, R. J., Flores Hernández, D., & Arce Ortega, J. M. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación. In *Universidad Nacional Agraria "La Molina"* (p. 180). https://es.scribd.com/doc/121876082/Manual-de-Analisis-de-Suelos

Fortnagel, P., Harms, H., Wittich, R. M., Krohn, S., Meyer, H., Sinnwell, V., Wilkes, H., & Francke, W. (1990). Metabolism of dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. strain HH69 and the mixed culture HH27. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(4), 1148–1156. https://doi.org/10.1128/aem.56.4.1148-1156.1990

Freilich, S., Zarecki, R., Eilam, O., Segal, E. S., Henry, C. S., Kupiec, M., Gophna, U., Sharan, R., & Ruppin, E. (2011). Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nature Communications*, *2*(1). https://doi.org/10.1038/ncomms1597

Gao, H., Zhang, J., Lai, H., & Xue, Q. (2017). Degradation of asphaltenes by two *Pseudomonas*

aeruginosa strains and their effects on physicochemical properties of crude oil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *122*, 12–22. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.04.010

García, J., Peñafiel, D., & Rodríguez, R. (2019). Bioremediación de hidrocarburos en aguas residuales con cultivo mixto de microorganismos: caso Lubricadora Puyango. *Enfoque UTE*, *10*(1), 185–196.

García, N., & Aguirre, M. (2014). *Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México*. *August*, 12.

Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., & Basri, M. (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *54*(1), 61–67. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.02.002

Ghollami, M., Roayaei, M., Ghavipanjeh, F., & Rasekh, B. (2013). Bioconversion of Heavy Hydrocarbon Cuts Containing High Amounts of Resins by Microbial Consortia. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, *04*(02), 2–6. https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000139

Gojgic-Cvijovic, G. D., Milic, J. S., Solevic, T. M., Beskoski, V. P., Ilic, M. V., Djokic, L. S., Narancic, T. M., & Vrvic, M. M. (2012). Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: A laboratory study. *Biodegradation*, *23*(1), 1–14. https://doi.org/10.1007/s10532-011-9481-1

Gudiña, E. J., Pereira, J. F. B., Costa, R., Evtuguin, D. V., Coutinho, J. A. P., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2015). Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. *Microbial Cell Factories*, *14*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s12934-015-

0197-5

Gudiña, E. J., & Teixeira, J. A. (2017). HC-0C-03: Biological Treatments to Improve the Quality of Heavy Crude Oils. In *Biodegradation and Bioconversion of Hydrocarbons* (pp. 337–351). https://doi.org/10.1007/978-981-10-0201-4

He, L., Feng, L., Xingang, L., Hong, S., & Zhenghe, S. (2015). Interfacial sciences in unconventional petroleum production: From fundamentals to applications. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 44, Issue 15). https://doi.org/10.1039/C5CS00102A

Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M. C., & Santoyo, G. (2010). Metagenómica de suelos: Grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton*, *79*, 133–139.

Hibbing, M. E., Fuqu, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Sewanee Review*, *8*(1), 15–25. https://doi.org/10.1353/sew.2015.0002

Jahromi, H., Fazaelipoor, M. H., Ayatollahi, S., & Niazi, A. (2014). Asphaltenes biodegradation under shaking and static conditions. *Fuel*, *117*(PART A), 230–235. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.09.085

Kashi, M. H., Tabatabaee, M. S., & Soleimani, N. A. (2018). Biodegradation of the Most Heavier Fraction of Crude Oil , Asphaltene , by Bacillus toyonensis BCT-7112. *Journal of Chemical Health Risks*, *8*(1), 65–74.

Khanpour-Alikelayeh, E., Partovinia, A., Talebi, A., & Kermanian, H. (2020). Investigation of Bacillus licheniformis in the biodegradation of Iranian heavy crude oil: A two-stage sequential approach containing factor-screening and optimization. *Ecotoxicology and*

Environmental Safety, *205*(July), 111103. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111103

Kim, K. H., Jahan, S. A., Kabir, E., & Brown, R. J. C. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, *60*, 71–80. https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019

Lane D. J., (1991). 16S723S rRNA sequencing, in Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt and M. Goodfellow, John wiley y Sons: Chichester, United Kingdom, p. 115-175.

Lavania, M., Cheema, S., Sarma, P. M., Mandal, A. K., & Lal, B. (2012). Biodegradation of asphalt by *Garciaella petrolearia* TERIG02 for viscosity reduction of heavy oil. *Biodegradation*, *23*(1), 15–24. https://doi.org/10.1007/s10532-011-9482-0

Li, C., Zhou, Z. X., Jia, X. Q., Chen, Y., Liu, J., & Wen, J. P. (2013). Biodegradation of crude oil by a newly isolated strain *Rhodococcus* sp. JZX-01. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *171*(7), 1715–1725. https://doi.org/10.1007/s12010-013-0451-4

Liu, X., Selonen, V., Steffen, K., Surakka, M., Rantalainen, A. L., Romantschuk, M., & Sinkkonen, A. (2019). Meat and bone meal as a novel biostimulation agent in hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere*, *225*, 574–578. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.053

Malagón, J., Montoya, G., & Ruiz, C. (2016). La competitividad del sector de hidrocarburos en las diferentes regiones de Colombia. *Cuadernos Programa de Las Naciones Unidas Para El Desarrollo (PNUD)*, 1–82.

Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Applied and*

Environmental Microbiology, *67*(7), 3127–3133. https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3127-3133.2001

Martínez Sepúlveda, J. A. (2018). Contaminación y remediación de suelos en Colombia: aplicación a la minería de oro. In *Contaminación y remediación de suelos en Colombia: aplicación a la minería de oro*. https://doi.org/10.21158/9789587565836

Medina, J., García, F., & Paricaguán, B. (2014). Biodegradacion de petroleo por microorganismos autoctonos en suelos contaminados provenientes de la bahıa de Amuay del Estado Falcon Petroleum biodegradation by indigenous microorganisms in contaminated soils from Amuay bay of Falcon State. *Revista Ingeniería UC*, *21*, 62–69.

Nkem, B. M., Halimoon, N., Yusoff, F. M., Johari, W. L. W., Zakaria, M. P., Medipally, S. R., & 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

Ojuederie, O. B., & Babalola, O. O. (2017). Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *14*(12). https://doi.org/10.3390/ijerph14121504

Patel, A. B., Shaikh, S., Jain, K. R., Desai, C., & Madamwar, D. (2020). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. *Frontiers in Microbiology*, *11*(November). https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562813

Pérez-Terrón, R., Gonzalez-Montfort, T. S. & Muñoz-Rojas, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (Lycopersicum esculentum Mill) y

maíz (Zea Mays). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, *1*(3), 53–60.

Pi, Y., Chen, B., Bao, M., Fan, F., Cai, Q., Ze, L., & Zhang, B. (2017). Microbial degradation of four crude oil by biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. *Bioresource Technology*, *232*, 263–269. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.007

Pineda-Flores, G., Boll-Argüello, G., Lira-Galeana, C., & Mesta-Howard, A. M. (2004). A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. *Biodegradation*, *15*(3), 145–151. https://doi.org/10.1023/B:BIOD.0000026476.03744.bb

Pineda-Flores, G., & Mesta-Howard, A. M. (2001). Petroleum asphaltenes: Generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, *43*(3), 143–150.

Podgorski, D. C., Corilo, Y. E., Nyadong, L., Lobodin, V. V., Bythell, B. J., Robbins, W. K., McKenna, A. M., Marshall, A. G., & Rodgers, R. P. (2013). Heavy petroleum composition. 5. Compositional and structural continuum of petroleum revealed. *Energy and Fuels*, *27*(3), 1268–1276. https://doi.org/10.1021/ef301737f

Pourfakhraei, E., Badraghi, J., Mamashli, F., Nazari, M., & Saboury, A. A. (2018). Biodegradation of asphaltene and petroleum compounds by a highly potent *Daedaleopsis* sp. *Journal of Basic Microbiology*, *58*(7), 609–622. https://doi.org/10.1002/jobm.201800080

Raju, M. N., Leo, R., Herminia, S. S., Morán, R. E. B., Venkateswarlu, K., & Laura, S. (2017). Biodegradation of Diesel, Crude Oil and Spent Lubricating Oil by Soil Isolates of *Bacillus* spp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *98*(5), 698–705.

https://doi.org/10.1007/s00128-017-2039-0

Ramos, J. L., Duque, E., Gallegos, M. T., Godoy, P., Ramos-González, M. I., Rojas, A., Terán, W., & Segura, A. (2002). Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *56*, 743–768. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161038

Santisi, S., Catalfamo, M., Bonsignore, M., Gentile, G., Di Salvo, E., Genovese, M., Mahjoubi, M., Cherif, A., Mancini, G., Hassanshahian, M., Pioggia, G., & Cappello, S. (2019). Biodegradation ability of two selected microbial autochthonous consortia from a chronically polluted marine coastal area (Priolo Gargallo, Italy). *Journal of Applied Microbiology*, *127*(3), 618–629. https://doi.org/10.1111/jam.14246

Sarkar, P., Roy, A., Pal, S., Mohapatra, B., Kazy, S. K., Maiti, M. K., & Sar, P. (2017). Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. *Bioresource Technology*, *242*, 15–27. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.010

SEKKOUR, S. (2019). the Diversity of Cultivable Hydrocarbon-Degrading Bacteria Isolated From Crude Oil Contaminated Soil and Sludge From Arzew Refinery in Algeria. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *9*(1), 70–77. https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.1.70-77

Semple, K. T., Morriss, A. W. J., & Paton, G. I. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: Fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*, *54*(4), 809–818. https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0564.x

Seo, J. S., Keum, Y. S., & Li, Q. X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. In

International Journal of Environmental Research and Public Health (Vol. 6, Issue 1). https://doi.org/10.3390/ijerph6010278

Serrano Silva, Í., E. da C. dos, Menezes, C. R. de, Faria, A. F. de, Franciscon, E., Grossman, M., & Durrant, L. R. (2009). Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology*, *100*(20), 4669–4675. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.079

Shahebrahimi, Y., Fazlali, A., Motamedi, H., & Kord, S. (2018). Experimental and Modeling Study on Precipitated Asphaltene Biodegradation Process Using Isolated Indigenous Bacteria. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *57*(50), 17064–17075. https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b04661

Shahebrahimi, Y., Fazlali, A., Motamedi, H., Kord, S., & Mohammadi, A. H. (2020). Effect of Various Isolated Microbial Consortiums on the Biodegradation Process of Precipitated Asphaltenes from Crude Oil. *ACS Omega*, *5*(7), 3131–3143. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02056

Shekoohiyan, S., Moussavi, G., & Naddafi, K. (2016). The peroxidase-mediated biodegradation of petroleum hydrocarbons in a H2O2-induced SBR using in-situ production of peroxidase: Biodegradation experiments and bacterial identification. *Journal of Hazardous Materials*, *313*, 170–178. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.081

Shi, B. H., Arunpairojana, V., Palakawong, S., & Yokota, A. (2002). *Tistrella mobilis* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate-producing bacterium belonging to α-Proteobacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*, *48*(6), 335–343.

https://doi.org/10.2323/jgam.48.335

Shibulal, B., Al-Bahry, S. N., Al-Wahaibi, Y. M., Elshafie, A. E., Al-Bemani, A. S., & Joshi, S. J. (2017). The potential of indigenous *Paenibacillus ehimensis* BS1 for recovering heavy crude oil by biotransformation to light fractions. *PLoS ONE*, *12*(2), 1–18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171432

Sjöblom, J., Simon, S., & Xu, Z. (2015). Model molecules mimicking asphaltenes. *Advances in Colloid and Interface Science*, *218*, 1–16. https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.01.002

Snowdon, L. R., Volkman, J. K., Zhang, Z., Tao, G., & Liu, P. (2016). The organic geochemistry of asphaltenes and occluded biomarkers. *Organic Geochemistry*, *91*, 3–15. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2015.11.005

Tavassoli, T., Mousavi, S. M., Shojaosadati, S. A., & Salehizadeh, H. (2012). Asphaltene biodegradation using microorganisms isolated from oil samples. *Fuel*, *93*, 142–148. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.10.021

Torres, S., Pandey, A., & Castro, G. R. (2011). Organic solvent adaptation of Gram positive bacteria: Applications and biotechnological potentials. *Biotechnology Advances*, *29*(4), 442–452. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.002

Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. C. R. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, *22*(2), 231–241. https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4

U.S. EPA. (1996). Soil Screening Guidance: User's Guide. EPA/540/R-96/018. *Superfund*, *July*. hero.epa.gov/index.cfm/reference/download/reference_id/755533

Uribe-Alvarez, C., Ayala, M., Perezgasga, L., Naranjo, L., Urbina, H., & Vazquez-Duhalt, R. (2011). First evidence of mineralization of petroleum asphaltenes by a strain of *Neosartorya fischeri*. *Microbial Biotechnology*, *4*(5), 663–672. https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00269.x

Vallejo, V., Sandoval, J., Garagoa, S., & Bastos, J. (2016). Evaluación del efecto de la bioestimulación sobre la biorremediación de hidrocarburos en suelos contaminados con alquitrán en Soacha , Cundinamarca - Colombia. *Acta Agronomica*, *65*(4), 354–361.

Yanto, D. H. Y., & Tachibana, S. (2014a). Enhanced biodegradation of asphalt in the presence of Tween surfactants, Mn2+ and H2O2 by Pestalotiopsis sp. in liquid medium and soil. *Chemosphere*, *103*, 105–113. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.044

Yanto, D. H. Y., & Tachibana, S. (2014b). Potential of fungal co-culturing for accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil. In *Journal of Hazardous Materials* (Vol. 278). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.039

Zafra, G., Absalón, Á. E., Anducho-Reyes, M. Á., Fernandez, F. J., & Cortés-Espinosa, D. V. (2017). Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. *Chemosphere*, *172*(55), 120–126. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.038

Zafra, G., Absalón, A. E., & Cortés-espinosa, D. V. (2013). *Determination of Bacterial Tolerance to High Concentrations of PAHs*. *June*.

Zafra, G., Absalón, Á. E., Cuevas, M. D. C., & Cortés-Espinosa, D. V. (2014). Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, *225*(2). https://doi.org/10.1007/s11270-013-1826-4

Zafra, G., Moreno-Montaño, A., Absalón, Á. E., & Cortés-Espinosa, D. V. (2014). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum. Environmental Science and Pollution Research*, *22*(2), 1034–1042. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3357-y

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

Zeng, J., Zhu, Q., Wu, Y., & Lin, X. (2016). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons using Bacillus subtilis CotA with high laccase activity and copper independence. *Chemosphere*, *148*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.019

Zhan, Y., Wang, Q., Chen, C., Kim, J. B., Zhang, H., Yoza, B. A., & Li, Q. X. (2017). Potential of wheat bran to promote indigenous microbial enhanced oil recovery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *44*(6), 845–855. https://doi.org/10.1007/s10295-017-1909-0

Zhang, G. L., Wu, Y. T., Qian, X. P., & Meng, Q. (2005). Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University: Science*, *6 B*(8), 725–730. https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0725

Zhang, X., Li, B., Wang, H., Sui, X., Ma, X., Hong, Q., & Jiang, R. (2012). *Rhizobium petrolearium* sp. nov., isolated from oilcontaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *62*(8), 1871–1876. https://doi.org/10.1099/ijs.0.026880-0

Zhao, H. P., Wang, L., Ren, J. R., Li, Z., Li, M., & Gao, H. W. (2008). Isolation and

characterization of phenanthrene-degrading strains *Sphingomonas* sp. ZP1 and *Tistrella sp*. ZP5. *Journal of Hazardous Materials*, *152*(3), 1293–1300. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.08.008

Zhao, S., Hu, C., Guo, L., Li, K., & Yu, H. (2019). Isolation of a 3-hydroxypyridine degrading bacterium, *Agrobacterium* sp. DW-1, and its proposed degradation pathway. *AMB Express*, *9*(1). https://doi.org/10.1186/s13568-019-0782-9

Apéndices

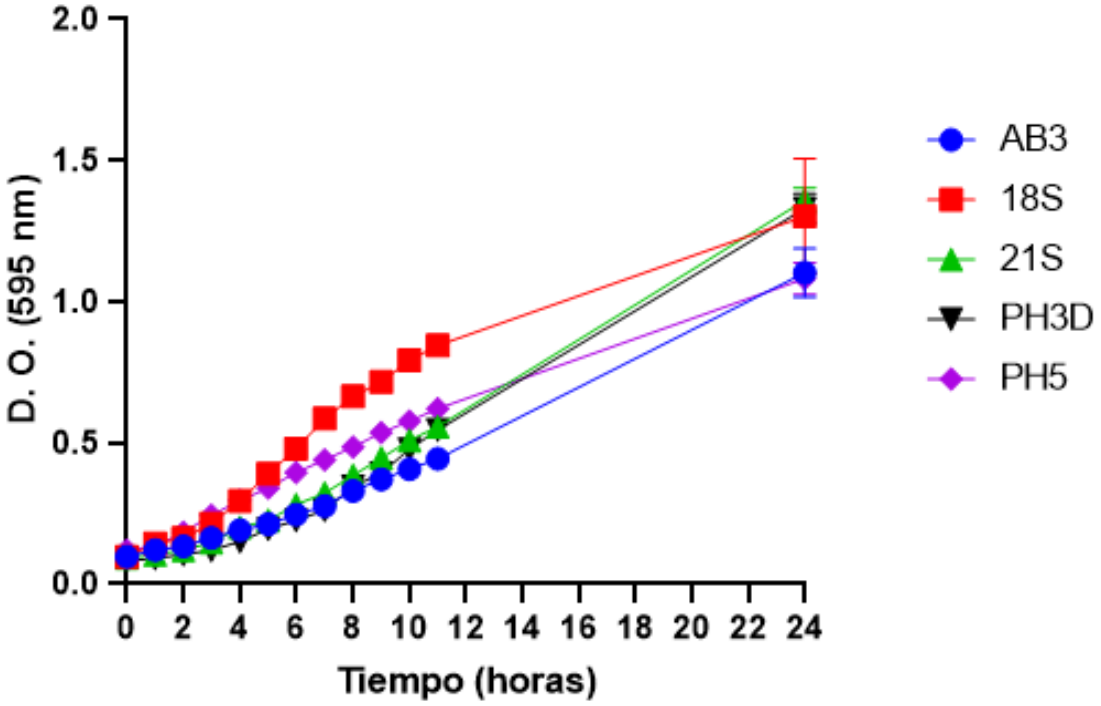
Apéndice A

Protocolo de extracción de ADN salting out para bacterias Gram negativas

1. Se cosecharon 4 o 5 colonias bacterianas en un vial con 1 ml de PBS 1X estéril. Se agitó en vórtex y se centrifugó a 6.000 rpm por 4 minutos.
2. Se retiró con cuidado el sobrenadante y se añadió 600 µl de buffer de lisis (Tris-HCL 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM).
3. Se agregó 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y 10 µl de SDS al 10%. Se agitó en vórtex y se incubó a 56 C durante 30 min con agitación cada 5 min.
4. Se agregó 150 µl de NaCl 6M, se mezcló en vórtex por 30 seg y se incubó a 4 °C durante 15 minutos.
5. Se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo vial.
6. Se agregó al sobrenadante 600 µl de isopropanol frio (-20 °C) y se mezcló por inversión durante 30 seg.
7. Se centrifugó a 4.000 rpm por 4 minutos y se eliminó el sobrenadante.
8. Se agregó 500 µl de etanol al 70%, se mezcló por inversión, se centrifugó a 4.000 rpm por 4 minutos y se retiró el sobrenadante por inversión.
9. Se dejó el vial abierto hasta la evaporación total del etanol.
10. Se agregó 50 µl TE 1X pH 7,5 y se incubó a 60 °C por 30 min para resuspender el ADN.
11. Se midió la concentración de ADN y se conservó a -20 °C.

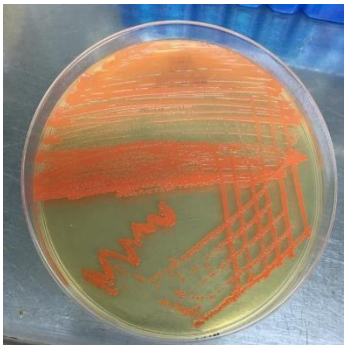
Apéndice B

Curvas de crecimiento microbiano en BHI liquido de los aislados pertenecientes al consorcio.

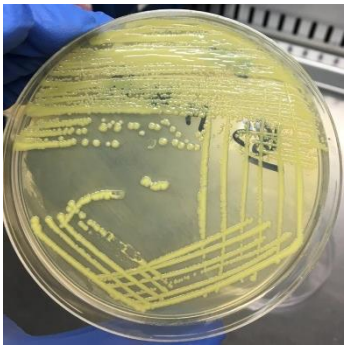


Apéndice C

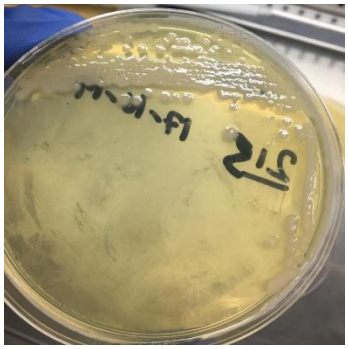
Morfología macroscópica de los aislados obtenidos



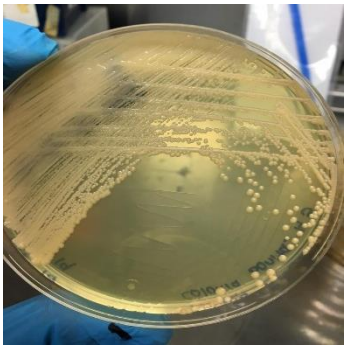
AB3



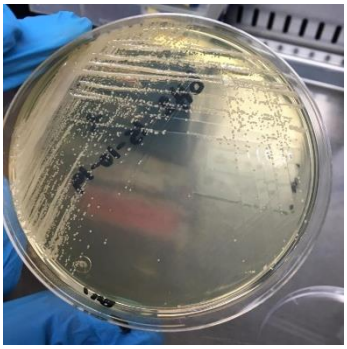
18S



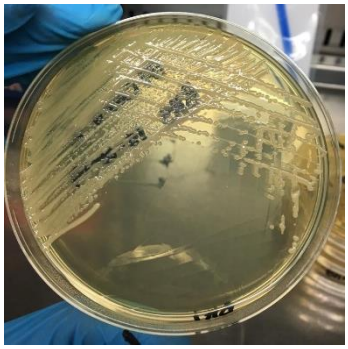
21S



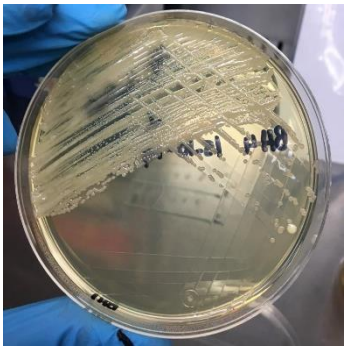
PH1



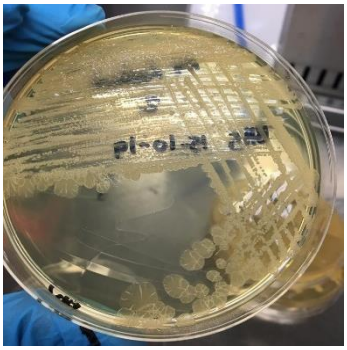
PH2



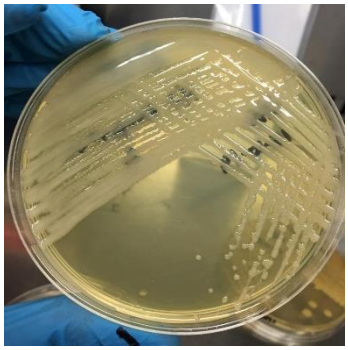
PH3



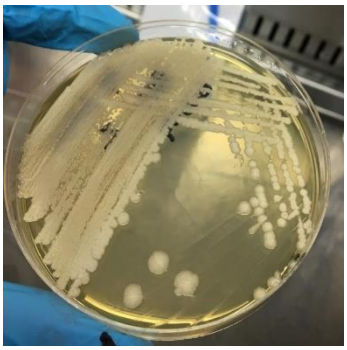
PH3D



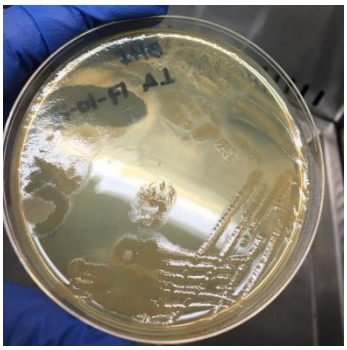
PH5



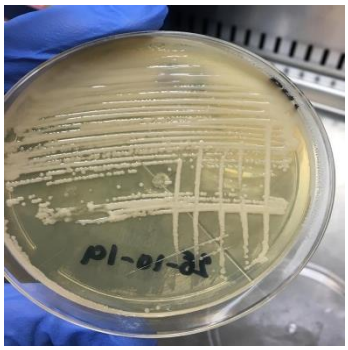
PH6



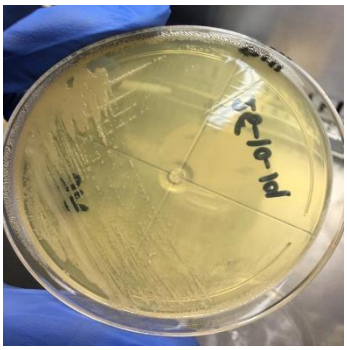
PH7



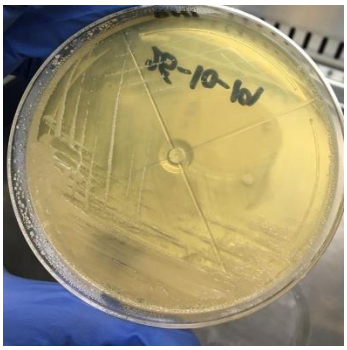
A1



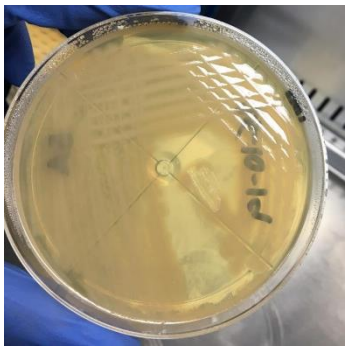
A2



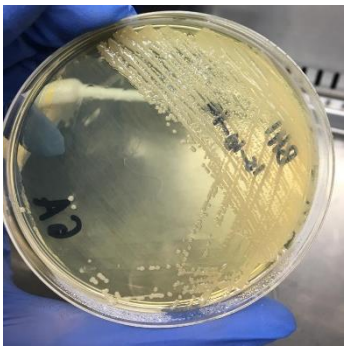
A3



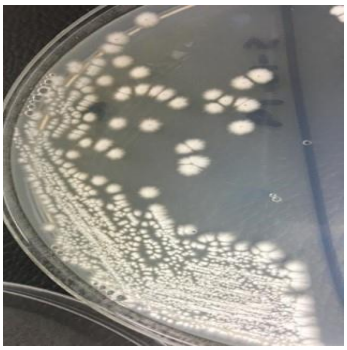
A4



A5



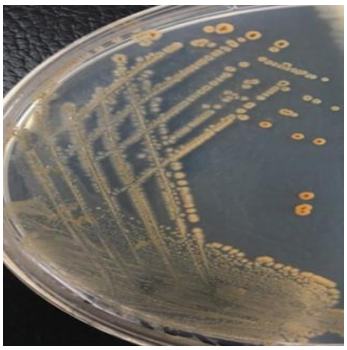
A6



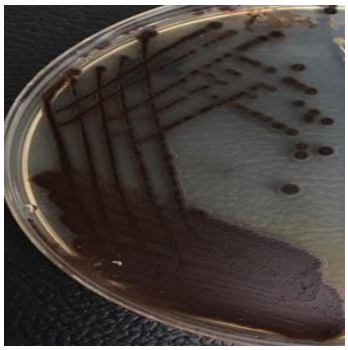
16S

17S

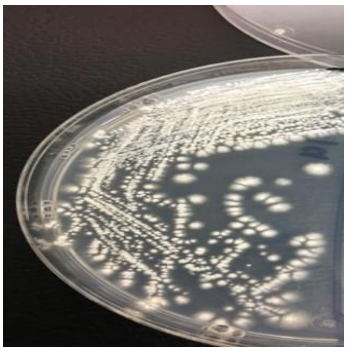
19S



23S



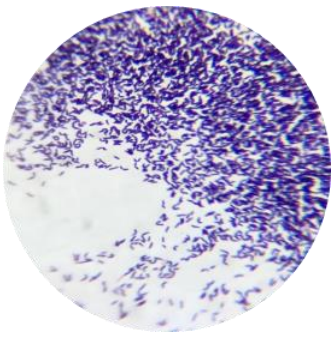
26S



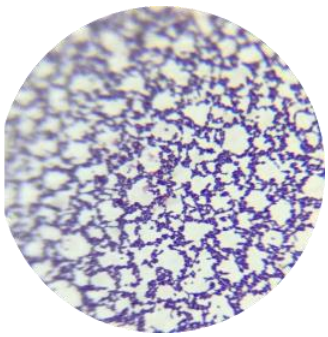
27S

Apéndice D

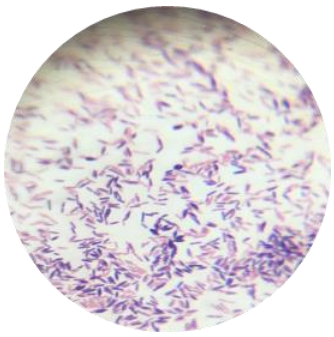
Morfología microscópica de los aislados obtenidos



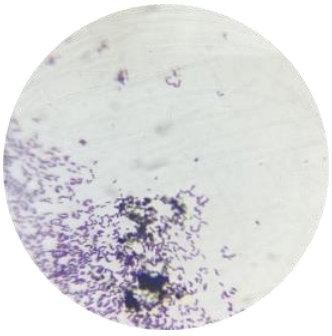
AB3



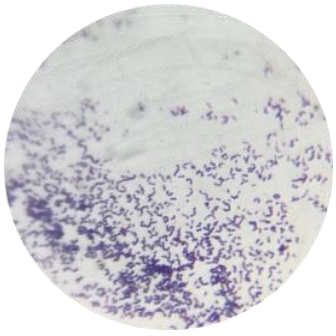
18S



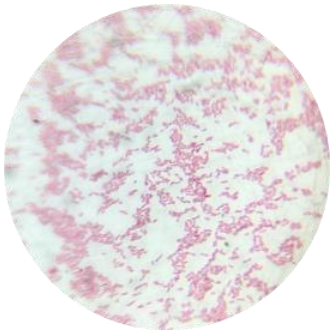
21S



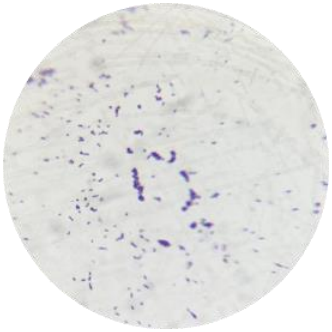
PH1



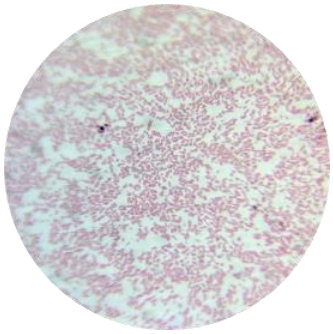
PH2



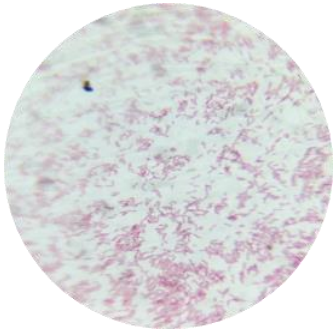
PH3



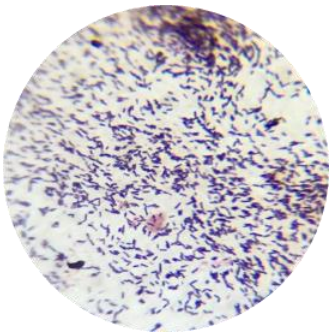
PH3D



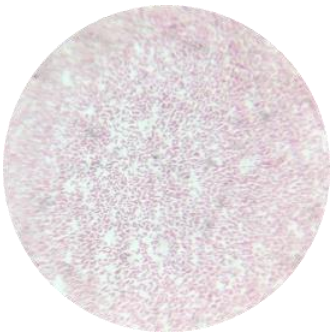
PH5



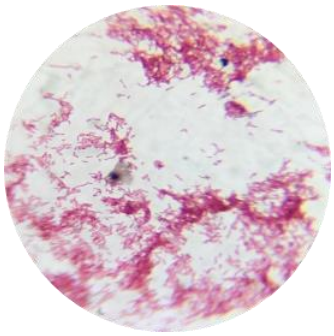
PH6



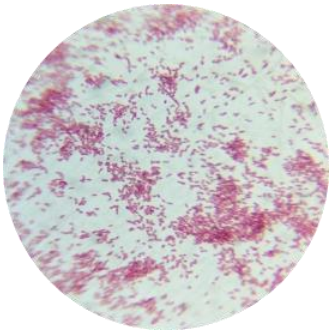
PH7



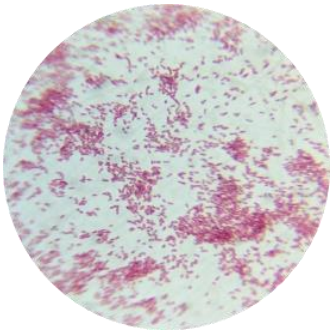
A1



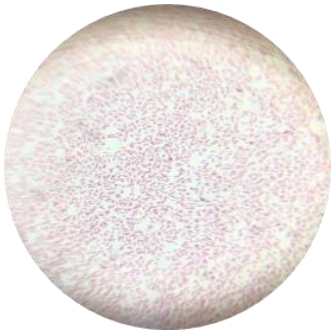
A2



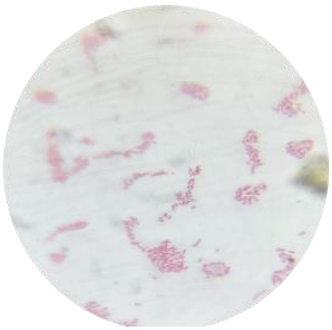
A3



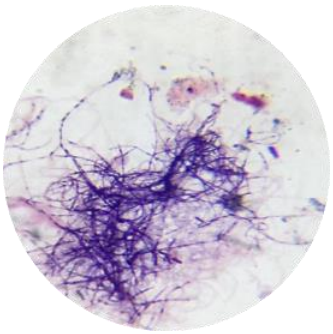
A4



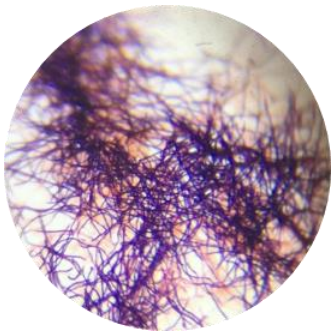
A5



A6

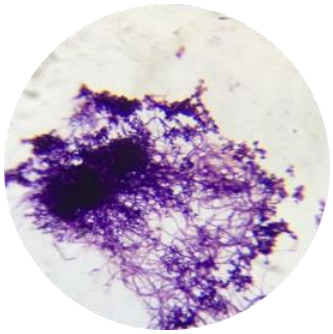


16S

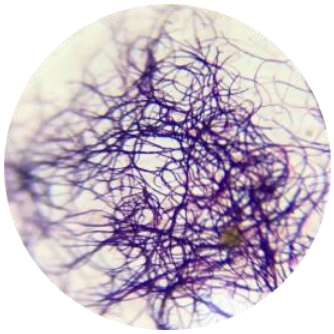


17S

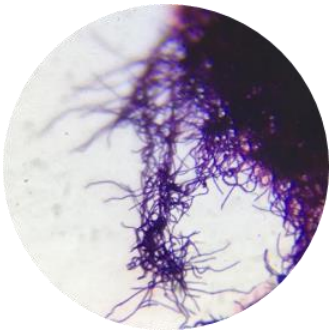
19S



23S



27S

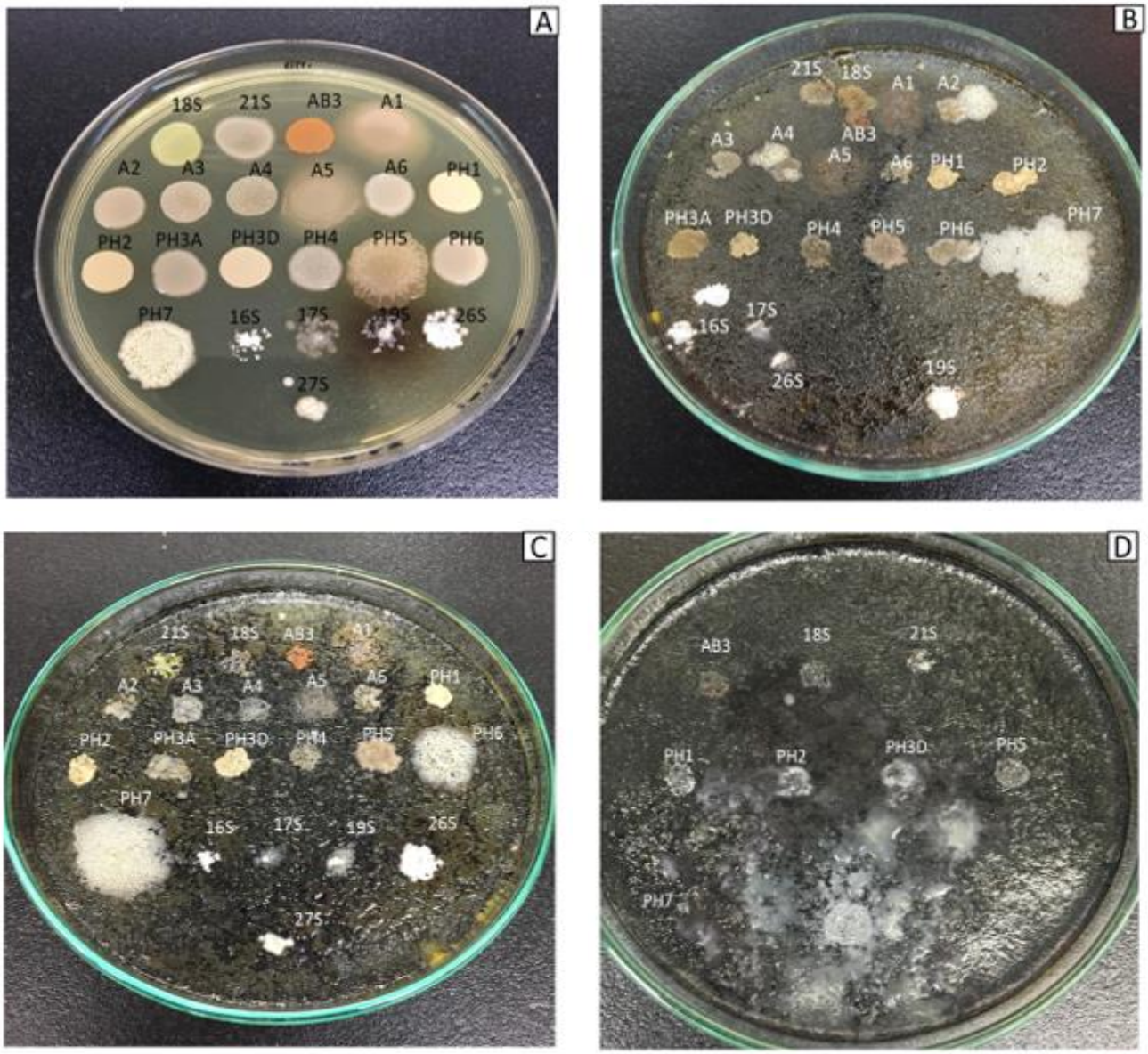


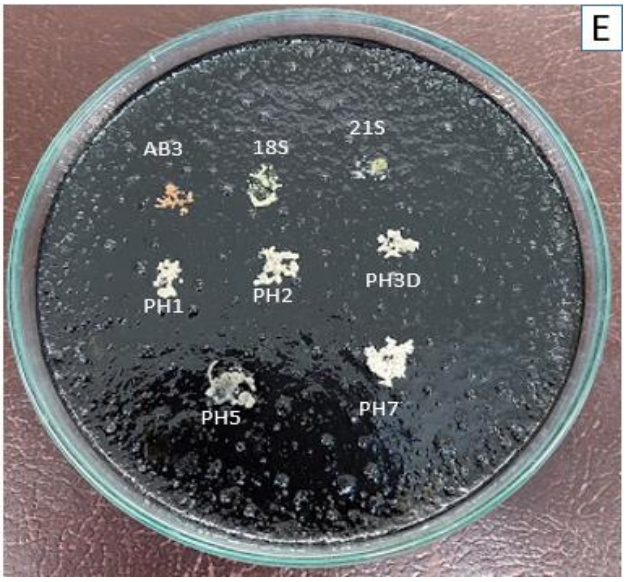
26S

Los aislados fueron teñidos mediante la coloración de Gram.

Apéndice E

Prueba de tolerancia de los aislados obtenidos hacia los asfaltenos del petróleo crudo.

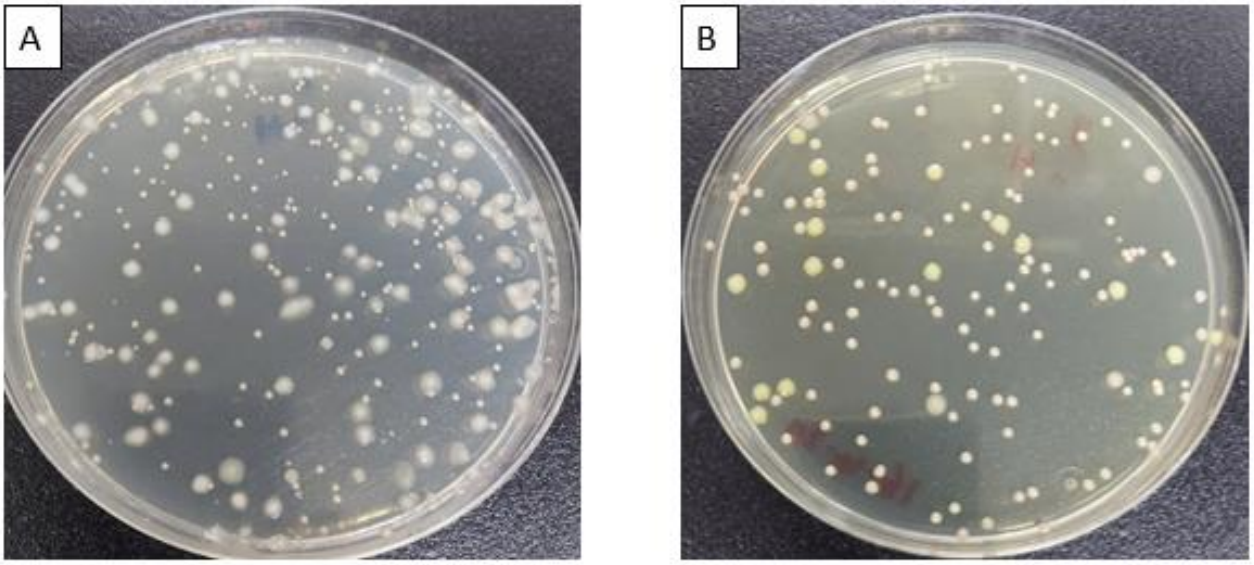




A. Control del crecimiento bacteriano en BHI sin presencia de asfaltenos (0 ppm), B. Crecimiento en BHI con 1.000 ppm de asfaltenos, C. Crecimiento en BHI con 6.000 ppm de asfaltenos, D. Crecimiento en BHI con 20.000 ppm de asfaltenos. E. Crecimiento en BHI con 60.000 ppm de asfaltenos.

Apéndice F

Aislamiento de microorganismos pasados 30 días de incubación en suelo contaminado con 5.000 ppm de asfaltenos (Dilución 10^{-4})



A. Réplica 1. B. Réplica 2.